

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



JC877 U.S. PTO
09/627787
07/27/00

Bescheinigung

Die Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH in Frankfurt am Main/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Konjugate und Verfahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendung zum Transport von Molekülen über biologische Membranen"

am 28. Juli 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Der Firmenname der Anmelderin wurde geändert in:
Aventis Pharma Deutschland GmbH.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 H, C 12 N und C 07 K der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 10. Mai 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 35 302.6

Beschreibung

- 5 Konjugate und Verfahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendung zum Transport von Molekülen über biologische Membranen

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Konjugate, Verfahren zu deren Herstellung und die Verwendung dieser Konjugate zum Transport von niedermolekularen Verbindungen und Makromolekülen über biologische Membranen, insbesondere zum Transport von Molekülen in Zellen. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Arzneimittel und Diagnostika sowie Test-Kits in denen diese Konjugate vorliegen bzw. eingesetzt werden.

- 15 Ein limitierender Faktor für die therapeutische Nutzung von Molekülen, deren Angriffspunkt sich innerhalb der Zelle befindet, ist oft deren unzulängliche zelluläre Aufnahme und ungünstige intrazelluläre Verteilung. Typische Beispiele sind Makromoleküle wie Nukleinsäuren, die in sequenzspezifischer Weise an die zelluläre DNA oder RNA binden und dadurch eine Inhibition der Genexpression bewirken.
- 20 Antisense Oligonukleotide sind kurze einzelsträngige Nukleinsäuren, die über Watson-Crick Basenpaaren an eine komplementäre mRNA binden, deren Übersetzung in das entsprechende Protein gehemmt werden soll. Triplex-bildende Oligonukleotide binden über sogenannte "Hoogsteen-Basenpaarung" in die große Furche der DNA-Doppelhelix unter Ausbildung einer Tripelhelix, wodurch die
- 25 Transkription der Gene sequenzspezifisch gehemmt wird. Andere intrazellulär wirkende Oligonukleotide sind beispielsweise die sogenannten "Decoy"-Oligonukleotide, die die Bindungsregionen für Transkriptionsfaktoren nachahmen. Durch die Behandlung mit Decoy-Oligonukleotiden lassen sich bestimmte Transkriptionsfaktoren sequenzspezifisch abfangen und dadurch eine Aktivierung
- 30 der Transkription verhindern. Eine weitere Gruppe von intrazellulär wirkenden Oligonukleotiden, die Chimeraplasten, werden zur gezielten Genkorrektur herangezogen (Cole-Strauss et al., Science 273 (1996) 1386-1389). Auch für diese Genkorrektur ist die Aufnahme des Chimeraplast-Oligonukleotids in die Zelle essentiell. Beispiele für weitere intrazellulär wirkende Nukleinsäuren sind solche,

welche mit zellulären Enzymen wechselwirken, insbesondere mit Telomerasen (Norton et al. Nat. Biotechn. (1996) 14, 615). Eine weitere Klasse von Nukleinsäuren, bevorzugt doppelsträngige DNA, können für bestimmte Proteine kodieren, die intrazellulär exprimiert werden im Sinne einer Gentherapie.

5

Beispielsweise ist die Aufnahme eines Oligonukleotids in vitro in eine Zelle, z.B. durch einfache Zugabe des Oligonukleotids ins Zellkultur Medium ein relativ ineffizienter Prozess, da nur ein kleiner Teil des zugesetzten Oligonukleotids tatsächlich in die Zelle aufgenommen wird. Der Aufnahmeprozess dauert viele

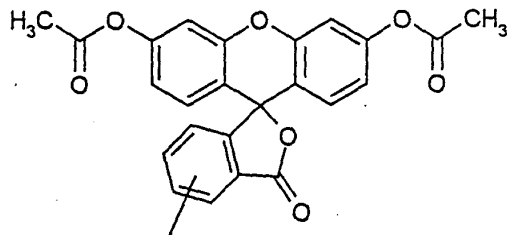
- 10 Stunden und meist wird erst nach 8 bis 16 Stunden eine Plateauphase erreicht. Man nimmt an, daß die Oligonukleotide in einem endozytoseartigen Prozess aufgenommen werden. Ein generelles Problem der Aufnahme über Endozytose besteht aber darin, daß ein Großteil der Oligonukleotide nicht frei im Zytoplasma, sondern in bestimmten Zellstrukturen, den Lysosomen und Endosomen,
- 15 eingeschlossen vorliegt. Diese punktförmige Verteilung ist im Falle fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide auch tatsächlich fluoreszenzmikroskopisch zu beobachten. Durch diese vesikuläre Lokalisierung ist die Konzentration an freiem Oligonukleotid, das tatsächlich für die Hybridisierung an die mRNA zur Verfügung steht, stark herabgesetzt. Außerdem nimmt, je nach Zelltyp und vorliegenden
- 20 Bedingungen, nur eine bestimmte Fraktion der Zellen das Oligonukleotid überhaupt auf. Daher werden zur effizienten Anwendung von Antisense Oligonukleotiden im allgemeinen Mischungen mit Penetrationsverstärkern wie beispielsweise kationische Lipide (Bennett et al. Mol. Pharmacol. 41 (1992) 1023) zur Anwendung gebracht.

- 25 Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand darin, die zelluläre Aufnahme von Molekülen, insbesondere von Makromolekülen wie beispielsweise Oligonukleotiden, zu verbessern.

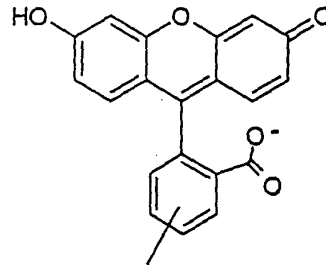
- Die Untersuchung der zellulären Aufnahme von Oligonukleotiden erfolgt im
- 30 allgemeinen entweder mit Hilfe radioaktiv markierter oder fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide. Die Fluoreszenzmarkierung eines Oligonukleotids erfolgt beispielsweise durch Umsetzung der Aminofunktion eines Oligonukleotids mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Zum Beispiel kann das Fluorescein an das 3'-Ende eines Oligonukleotids über einen kommerziell erhältlichen Fluorescein-derivatisierten

Festphasenträger oder an das 5'-Ende über ein kommerziell erhältliches Fluorescein-Phosphitylierungsreagenz eingeführt werden. In allen Fällen liegt das an das Oligonukleotid gebundene Fluorescein aufgrund der Carbonsäurefunktion als negativ geladenes Strukturelement vor, das stark fluoreszierend ist.

5



FDA-Rest (F3)



Fluorescein-Rest (F0)

- Im Gegensatz zu Fluorescein ist Fluoresceindiacetat (FDA) ein neutraler Vitalfarbstoff, der erst nach Spaltung der beiden Estergruppen und Öffnung des Lacton-Rings in das fluoreszierende Fluorescein übergeht, der aber in Form des Lactons noch keine Fluoreszenz aufzeigt.

- Es ist bekannt, daß FDA (nachfolgend auch als „F3“ bezeichnet) als neutrales nichtfluoreszierendes Molekül von lebenden Zellen durch passive Diffusion aufgenommen und intrazellulär von Esterasen in das fluoreszierende Fluorescein gespalten wird (Breeuwer et al. Appl. Environ. Microbiol. (1995) 61, 1614; Maeda et al. Cell Struct. Funct. (1982) 7, 177). Bisher wurden nur FDA-Derivate, die eine Amin-reaktive Gruppe wie z.B. Isothiocyanat enthalten, beschrieben; diese FDA-Derivate werden zur Färbung von intrazellulären Proteinen oder Zellkomponenten eingesetzt. Darüber hinaus wurden bisher keine Konjugate von FDA mit anderen Molekülen beschrieben; entsprechend wurden auch FDA-markierte Oligonukleotide (Konjugate aus FDA und Oligonukleotid) bisher nicht beschrieben.
- Im Zytoplasma wird FDA durch Esterasen gespalten; durch eine FDA-Markierung eines Oligonukleotids ist es deshalb möglich, den Anteil an "freiem" Oligonukleotid

zu bestimmen, d.h. wieviel Oligonukleotid im Zytoplasma vorliegt - und für die Hybridisierung zur Verfügung steht - im Verhältnis zu dem Anteil an Oligonukleotid, der in Vesikeln vorliegt ("gefangenes" Oligonukleotid) - und deshalb nicht für die Hybridisierung zur Verfügung steht. Bedingt durch die insgesamt hohe Anzahl negativer Ladungen in einem Oligonukleotid und die Tatsache, daß sich FDA-markierte und Fluorescein-markierte Oligonukleotide (für den Fall, daß das Oligonukleotid das gleiche ist) nur durch eine Nettoladung unterscheiden, war zu erwarten, daß FDA-markierte und Fluorescein-markierte Oligonukleotide eine sehr ähnliche zelluläre Aufnahme und Verteilung zeigen würden.

10

Überraschend wurde jedoch gefunden, daß sich FDA-markierte und Fluorescein-markierte Oligonukleotide deutlich im Bezug auf ihre Aufnahme in Zellen unterscheiden und zwar sowohl im Hinblick auf die Dauer als auch die Effizienz der Aufnahme der Oligonukleotide und darüber hinaus auch im Hinblick auf die Lokalisation der aufgenommenen Oligonukleotide in der Zelle. Ein mit FDA markiertes Oligonukleotid wird sehr viel schneller von Zellen aufgenommen als das entsprechende Fluorescein-markierte Oligonukleotid. Während die Aufnahme radioaktiv-markierter und Fluorescein-markierter Oligonukleotide mehrere Stunden erfordert, konnten die FDA-markierten Oligonukleotide nach einfacher Inkubation, beispielsweise mit humanen Zellen, bereits nach fünf Minuten intrazellulär nachgewiesen werden. Überraschend war auch, daß die FDA-markierten Oligonukleotide in nahezu alle Zellen (>90% der Zellen) aufgenommen wurden, während die Aufnahmerate bei den bisher beschriebenen Methoden Oligonukleotide bzw. Polynukleotide in Zellen einzubringen im allgemeinen wesentlich niedriger ausfällt; häufig werden dort nur etwa 30 bis 60% der Zellen mit Oligonukleotiden beladen. Vorteilhaft ist auch die intrazelluläre Verteilung der FDA-markierten Oligonukleotide, die viel gleichmäßiger ist. Diese gleichmäßigere Verteilung deutet darauf hin, daß die Oligonukleotide nicht - wie oben beschrieben - zum großen Teil in Vesikeln (z.B. Endosomen, Lysosomen) eingeschlossen vorliegen, sondern, in der gesamten Zelle - d.h. im Zytosol und im Nucleus - verteilt sind; dies ist ein Indiz dafür, daß ein großer Anteil an "freiem" Oligonukleotid vorliegt. Nur diese „freien“ Oligonukleotide stehen für die Bindung an das Target oder als Wirkstoff zur Verfügung. Von Vorteil ist auch, daß mit den FDA-markierten Oligonukleotiden keine Schädigung der Zellen beobachtet werden konnte; im Gegensatz dazu führt

30

die Verwendung von lipokationischen Penetrationsverstärkern oft zu Schädigungen der Zellmembran. Bedingt durch diese unerwarteten Eigenschaften haben die FDA-markierten Oligonukleotide gegenüber den bisher beschriebenen Methoden Oligonukleotide bzw. Polynukleotide in Zellen einzubringen den entscheidenden

5 Vorteil, daß sie effektiver in die Zellen eingebracht werden können und dort auch besser verfügbar sind. Dadurch bedingt weisen die FDA-markierten Oligonukleotide eine deutlich verbesserte biologische Wirksamkeit auf. Aufgrund der verbesserten biologischen Wirksamkeit muß weniger Oligonukleotid eingesetzt werden. Dadurch und aufgrund der Tatsache, daß ein FDA-markiertes Oligonukleotid effektiver –

10 sowohl mengenmäßig als auch zeitlich - in eine Zelle aufgenommen wird, werden (toxische) Nebenwirkungen reduziert.

Überraschend wurde gefunden, daß die vorteilhaften Eigenschaften nicht auf FDA-markierte Oligonukleotide beschränkt sind, sondern praktisch jedes Molekül mit Hilfe

15 einer FDA-Markierung – d.h. dadurch, das ein zu transportierendes Molekül an FDA gekoppelt bzw. konjugiert wird („FDA-Konjugat“) - effektiv in eine Zelle eingebracht bzw. über eine biologische Membran transportiert werden kann. Weiterhin wurde gefunden, daß dieses Prinzip nicht auf FDA-Konjugate beschränkt ist, sondern sich auf alle Arylester-Konjugate, die eine bestimmte chemische Struktur aufweisen,

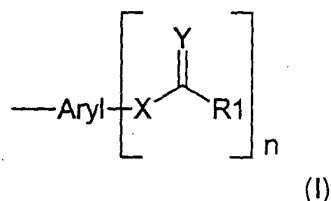
20 erstrecken. Die vorliegende Erfindung stellt somit ein neues Prinzip zum Transport von Molekülen über biologische Membranen bereit. Da diese Verbindungen bis her im Stand der Technik, von einer Ausnahme abgesehen, nicht beschrieben sind, sind auch die entsprechenden Konjugate – ein zu transportierendes Molekül gekoppelt bzw. konjugiert an einen Arylester bestimmter chemischer Struktur, Gegenstand der

25 vorliegenden Erfindung. Diese Konjugate lassen sich nach bekannten Verfahren nicht herstellen; Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein Verfahren zur Herstellung der Konjugate.

Bekannt sind bioreversible O-Acylaryl-Konjugate, die als Pro-Drugs von

30 Oligonukleotiden vorgeschlagen wurden (Iyer et al., Bioorganic & Med. Chem. Lett. 7 (1997) 871-876). Diese Verbindungen ähneln – für den Fall, daß der Aryl-Rest ein aromatischer 6-Ring ist - in ihrer chemischen Struktur den erfindungsgemäßen Konjugaten. Bei den bioreversiblen O-Acylaryl-Konjugaten bewirkt die Hydrolyse des Esters jedoch eine Destabilisierung der Bindung zwischen dem Aryl-Rest und dem

- Phosphotriester des Oligonukleotids, so daß das bioreversible O-Acylaryl-Konjugate in seine Bestandteile, d.h. in das freie Oligonukleotid und die O-Acylaryl-Rest, gespalten. Dieses Pro-Drug-Konzept dient dazu, die negative Ladung der Internukleotid-Phosphatbrücke zu maskieren und dadurch die Aufnahme des
- 5 Oligonukleotids in die Zelle zu erleichtern. Im Gegensatz zu den erfindungsgemäßen Konjugaten wurde bei diesen Pro-Drugs aber keine beschleunigte Aufnahme der Oligonukleotide in die Zellen und auch keine veränderte intrazellulären Verteilung der Oligonukleotide festgestellt. Weiterhin wurde nicht über eine Aufnahme der Oligonukleotide in andere Organismen berichtet. Im Gegensatz dazu bleibt bei den
- 10 erfindungsgemäßen Konjugate die kovalente Bindung zwischen dem Aryl-Rest und dem Oligonukleotid bei der Aufnahme in die Zelle erhalten; der Erhalt der kovalenten Bindung zwischen Aryl-Rest und Oligonukleotid kann leicht
- fluoreszenzmikroskopisch festgestellt werden, sofern die aromatische Einheit, wie beispielsweise bei FDA, erst nach Spaltung des Esters eine Fluoreszenz aufweist.
- 15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Konjugat, das aus mindestens einem zu transportierenden Molekül und mindestens einem Aryl-Rest der Formel I besteht, wobei



20

wobei

- Aryl eine Gruppe ist, die mindestens einen Ring enthält, der aromatischen Charakter besitzt;
- X O oder N ist; vorzugsweise ist X = O;
- 25 Y O, S oder NH-R² ist; vorzugsweise ist Y = O
- R¹ ein substituierter oder unsubstituierter C₁-C₂₃ Alkylrest, der gerade oder verzweigt sein und Doppel- und/oder Dreifachbindungen enthalten kann, ist; beispielsweise ein Arylalkyl-Rest;

- R^2 ein substituierter oder unsubstituierter C_1 - C_{18} Alkylrest, der gerade oder verzweigt sein und Doppel- und/oder Dreifachbindungen enthalten kann, ist; und
- n eine ganze Zahl größer oder gleich 1 ist.

5

wobei der Aryl-Rest entweder direkt über eine chemische Bindung oder indirekt über eine chemische Gruppe an das zu transportierende Molekül gebunden ist, wobei die chemische Gruppe keine CH_2 -S-Gruppe ist, wenn die Bindung über eine Internukleotid Phosphodiester-Bindung des zu transportierenden Moleküls erfolgt.

10

Das zu transportierende Molekül kann jedes beliebige Molekül sein. Eine Ausführungsform der Erfindung betrifft Konjugate, bei denen das zu transportierende Molekül ein Makromolekül ist, z.B. mit einem Molekulargewicht > 500 Dalton, vorzugsweise > 1000 Dalton, besonders bevorzugt > 2000 Dalton oder größer ist.

15

Das zu transportierende Molekül kann auch eine niedermolekulare Verbindung sein, beispielsweise mit einem Molekulargewicht < 500 Dalton. Die niedermolekulare Verbindung kann ein Mononukleotid sein.

Das zu transportierende Molekül kann verschiedenen chemischen Substanzklassen angehören, z.B. kann es ein Biopolymer, z.B. ein Polynukleotid, vorzugsweise ein

20

Oligonukleotid, ein Polypeptid, vorzugsweise ein Peptid oder Protein, eine Peptid-Nucleinsäure (PNA) oder ein Polyamid, das die drei aromatischen Ringe Imidazol, Pyrrol und Hydroxypyrrol enthält (Kielkopf et al. Science 282, 111-115 (1998)) oder ein Polysaccharid, vorzugsweise ein Oligosaccharid oder ein der Derivat der genannten Verbindungen sein. Das zu transportierende Molekül kann ein

25

Peptidmimetikum sein.

Polynukleotide, Oligonukleotide und Mononukleotide sind entweder natürlich vorkommende Nukleinsäuren oder bekannte Derivate derselben. Unter Derivaten versteht man u.a. die von dem zu transportierenden Molekül bzw. Konjugat abgeleiteten Salze, insbesondere deren physiologisch verträgliche Salze und auch z.B. modifizierte bzw. stabilisierte Nukleinsäuren.

30

Das zu transportierende Molekül kann ein Inhibitor von Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise NF- κ B, c-fos oder c-jun, Zellzyklus-Proteinen wie etwa Cyclin D, Kinasen wie c-Src-, Tyrosine- oder MAP-Kinasen, intrazellulären Ionenkanälen,

Immunophilinen wie etwa der FK506 Binding Proteine, Prolyl-4-hydroxylase, Topoisomerasen, viralen Proteasen, Multiple Drug Resistance Proteinen, Phosphatasen wie etwa Protein Tyrosine Phosphatase sein.

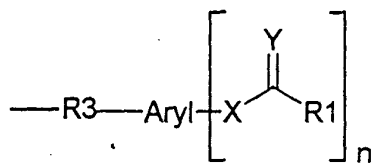
Das zu transportierende Molekül kann an einen oder mehrere Aryl-Reste konjugiert sein, beispielsweise zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht, neun, zehn, fünfzehn, zwanzig oder mehr Aryl-Reste.

Der Aryl-Rest („Aryl-Rest“ steht insbesondere für einen Aryl-Rest der Formel I und/oder einen Aryl-Rest der Formel II) kann einfach oder mehrfach an das zu transportierende Molekül gebunden sein, wobei die Bindungen an unterschiedlichen Positionen des Aryl-Restes lokalisiert sein können. Sind mehrere Aryl-Reste an das zu transportierende Molekül gebunden, so können diese gleich oder verschieden sein.

Der Aryl-Rest enthält eine Arylgruppe (in Formeln I und II als „Aryl“ bezeichnet); die Arylgruppe kann aus einem oder mehreren Ringen bestehen, wobei aber mindestens einer der Ringe aromatischen Charakter besitzt. Die Arylgruppe kann auch heterozyklische Ringe enthalten, die gegebenenfalls aromatischen Charakter besitzen. Die Arylgruppe enthält beispielsweise 1 bis 8 oder mehr Ringe (auch „Ringsystem“), vorzugsweise 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 oder 8 Ringe. Die einzelnen Ringe habe eine Größe von 3 bis 7 Ringatomen, bevorzugt 5 bis 6 Ringatomen. Beispiele für Ringsysteme sind Phenyl-ringe, Pyridinyl-ringe, Pyrimidinyl-ringe, Pyrrolyl-ringe, Furanyl-ringe, Thiophenyl-ringe, 5-Ring-Lactone, 6-Ring-Lactone, Spirolactone, Benzochinone, Cyclohexadienyl-ringe und Cyclohexenyl-ringe. Diese Ringsysteme, die Arylgruppe bzw. einzelne Ringe der Arylgruppe können ein oder mehrfach substituiert sein. Vorzugsweise ist an mindestens einen der Ringe der Arylgruppe ein Acylrest gebunden.

Die Arylgruppe kann beispielsweise eine der der Formeln F1', F2', F3', F4', F6', F7', F8', F9', F10', F11' haben. Diese Formeln sind in Abbildung 1 abgebildet.

Der Aryl-Rest kann direkt an das zu transportierende Moleküle gebunden sein, oder über eine chemische Gruppe. Gegenstand der Erfindung ist ein Konjugat, wobei die chemische Gruppe zusammen mit dem Aryl-Rest die Formel II hat,



wobei Aryl, X, Y und R¹ wie oben definiert sind und

R³ die chemische Gruppe bedeutet, wobei R³ beispielsweise eine –C(=O)-Gruppe oder eine –NH-C(=S)-Gruppe ist.

5

Beispiele für Aryl-Reste der Formel II sind die Aryl-Reste mit den Formeln F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10 und F11; diese Formeln sind in Abbildung 2 a und Abbildung 2 b abgebildet.

10

In einer besonderen Ausführungsform ist das zu transportierende Molekül ein Oligonukleotid. Ein Oligonukleotid kann beispielsweise vollständig aus den Nukleotiden Adenosinphosphat, Guanosinphosphat, Inosinphosphat, Cytidinphosphat, Uridinphosphat und Thymidinphosphat aufgebaut sein. In anderen Ausführungsformen der Erfindung kann ein Oligonukleotid gegebenenfalls ein oder mehrere Modifikationen, beispielsweise chemische Modifikationen, enthalten. Ein Oligonukleotid kann mehrere gleiche und/oder verschiedene Modifikationen aufweisen.

15

Beispiele für chemische Modifikationen sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise in E. Uhlmann and A. Peyman, Chemical Reviews 90 (1990) 543 und "Protocols for Oligonukleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993 und J. Hunziker und C. Leumann 'Nucleic Acid Analogs: Sythesis and Properties' in Modern Synthetic Methods (Ed. Beat Ernst und C. Leumann) Verlag Helvetica Chimica Acata, Basel, S 331-417, beschrieben.

20

Die chemische Modifikation eines Oligonukleotids kann beispielsweise

a) den vollständigen oder teilweisen Ersatz der Phosphorsäurediesterbrücken, beispielsweise durch Phosphorothioat-, Phosphorodithioat-, NR¹R^{1'}-Phosphoramidat-, Boranophosphat-, Phosphat-(C₁-C₂₁)-O-Alkylester, Phosphat-[(C₆-C₁₂)Aryl-(C₁-C₂₁)-

30

- O-Alkyl]ester, (C₁-C₈)Alkylphosphonat- und/oder (C₆-C₁₂)-Arylphosphonat-Brücken, wobei
- R¹ und R^{1'} unabhängig voneinander für Wasserstoff, (C₁-C₁₈)-Alkyl, (C₆-C₂₀)-Aryl, (C₆-C₁₄)-Aryl-(C₁-C₈)-alkyl, bevorzugt für Wasserstoff, (C₁-C₈)-Alkyl und/oder
- 5 Methoxyethyl, besonders bevorzugt für Wasserstoff, (C₁-C₄)-Alkyl und/oder Methoxyethyl stehen
- oder
- R¹ und R^{1'} zusammen mit dem sie tragenden Stickstoffatom einen 5-6-gliedrigen heterocyclischen Ring bilden, der zusätzlich ein weiteres Heteroatom aus der Reihe
- 10 O, S, N enthalten kann;
- b) den vollständigen oder teilweisen Ersatz der 3'- und/oder 5'-Phosphorsäurediesterbrücken durch "Dephospho"-Brücken (beschrieben beispielsweise in Uhlmann, E. und Peyman, A. in "Methods in Molecular Biology",
- 15 Vol. 20, "Protocols for Oligonukleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, Chapter 16, 355ff), beispielsweise durch Formacetal, 3'-Thioformacetal, Methylhydroxylamin, Oxim, Methylendimethylhydrazo, Dimethylensulfon und/oder Silylgruppen;
- c) den vollständigen oder teilweisen Ersatz des Zuckerphosphat-Rückgrats, beispielsweise durch "Morpholino"-Oligomere (beispielsweise in E. P. Stirchak et al.,
- 20 Nucleic Acids Res. 17 (1989) 6129 und in J. Summerton and D. Weller, Antisense and Nucleic Acid Drug Dev. 7 (1997) 187-195 beschrieben) und/oder durch Polyamid Nukleinsäuren ("PNAs") (beispielsweise beschrieben in P. E. Nielsen et al, Bioconj. Chem. 5 (1994) 3) und/oder Phosphomonosäureester Nukleinsäuren
- 25 ("PHONAs") (beschrieben beispielsweise in Peyman et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35 (1996) 2632-2638);
- d) den vollständigen und/oder teilweisen Ersatz der β-D-2'-Desoxyriboseeinheiten, beispielsweise durch α-D-2'-Desoxyribose, L-2'-Desoxyribose, 2'-F-2'-Desoxyribose, 2'-O-(C₁-C₆)Alkyl-Ribose, 2'-O-(C₂-C₆)Alkenyl-
- 30 Ribose, 2'-[O-(C₁-C₆)Alkyl-O-(C₁-C₆)Alkyl]-Ribose, 2'-NH₂-2'-desoxyribose, β-D-Xylofuranose, α-Arabinofuranose, 2,4-Dideoxy-β-D-erythro-hexo-pyranose, conformativ eingeschränkte Zuckeranaloga wie LNA (Locked nucleic acids; Singh et al., Chem. Commun. 4 (1998) 455; Singh et al. Chem. Commun. 12 (1998) 1247) und carbocyclische (beschreiben beispielsweise in Froehler, J. Am. Chem. Soc. 114

(1992) 8320) und/oder offenkettige Zuckeranaloga (beschrieben beispielsweise in Vandendriessche et al., Tetrahedron 49 (1993) 7223) und/oder Bicyclozuckeranaloga (beschrieben beispielsweise in M. Tarkov et al., Helv. Chim. Acta 76 (1993) 481);

- 5 e) die Modifikation beziehungsweise den vollständigen oder teilweisen Ersatz der natürlichen Nucleosid-Basen, beispielsweise durch 5-(Hydroxymethyl)uracil, 5-Aminouracil, Pseudouracil, Pseudoisocytosin, Dihydrouracil, 5-(C₁-C₆)-Alkyl-uracil, 5-(C₂-C₆)-Alkenyl-uracil, 5-(C₂-C₆)-Alkynyl-uracil, 5-(C₁-C₆)-Alkyl-cytosin, 5-(C₂-C₆)-Alkenyl-cytosin, 5-(C₂-C₆)-Alkynyl-cytosin, 5-Fluoruracil, 5-Fluorcytosin, 5-Chloruracil, 10 5-Chlorcytosin, 5-Bromuracil, 5-Bromcytosin oder 7-Deaza-7-substituierte Purine beinhalten.

- Die chemische Modifikation eines Oligonukleotids umfaßt weiterhin die Bindung eines Oligonukleotids an ein oder mehrere weitere Moleküle, die besondere
- 15 Eigenschaften des Oligonukleotids, z.B. Nukleasestabilität, Affinität zur Target-Sequenz und Pharmakokinetik günstig beeinflussen, z.B. bei der Hybridisierung des modifizierten Oligonukleotids an die Target-Sequenz diese unter Bindung und/oder Quervernetzung angreifen. Beispiele dafür solche weiteren Moleküle sind Poly-Lysin, Interkalatoren wie Pyren, Acridin, Phenazin und Phenanthridin, fluoreszierende
- 20 Verbindungen wie Fluorescein, Cross-Linker wie Psoralen und Azidoproflavin, lipophile Moleküle wie (C₁₂-C₂₀)-Alkylgruppen, vorzugsweise (C₁₂-C₂₀)-Alkylgruppen, Lipide wie 1,2-Di-hexadecyl-rac-glycerin, Steroide wie Cholesterin oder Testosteron, Vitamine wie Vitamin E, Poly- bzw. Oligo-ethylenglycol, (C₁₂-C₁₈)-Alkyl-
- 25 Phosphatdiestern, vorzugsweise (C₁₄-C₁₈)-Alkyl-Phosphatdiestern und -O-CH₂-CH(OH)-O-(C₁₂-C₁₈)-Alkylgruppen, vorzugsweise -O-CH₂-CH(OH)-O-(C₁₂-C₁₆)-Alkylgruppen. Diese weiteren Moleküle können am 5'- und/oder am 3'-Ende und/oder innerhalb der Sequenz, z.B. an eine Nukleobase konjugiert sein. Die Verfahren zur Herstellung derart modifizierter Oligonukleotide sind dem Fachmann bekannt und z.B. in Uhlmann, E. & Peyman, A., Chem. Rev. 90 (1990) 543 und/oder
- 30 M. Manoharan in "Antisense Research and Applications", Crooke and Lebleu, Eds., CRC Press, Boca Raton, 1993, Chapter 17, S.303ff. und/oder EP-A 0 552 766 beschrieben.

In weiteren, speziellen Ausführungsformen der Erfindung kann das Oligonukleotid am 3' und/oder am 5'-Ende 3'-3'- und/oder 5'-5'-Inversionen aufweisen. Diese Art der chemischen Modifikation ist dem Fachmann bekannt und beispielsweise in M. Koga et al., J. Org. Chem. 56 (1991) 3757 beschrieben.

5

Bei einem Konjugat, daß aus einem oder mehreren Oligonukleotiden und einem oder mehreren Aryl-Resten, vorzugsweise der Formel I oder II besteht, kann die Anbindung (Konjugation) von Aryl-Resten an ein Oligonukleotid beispielsweise am 5'-Ende (A), am 3'-Ende (F), an die heterozyklische Base (E und G), an den Zucker (C) oder an die Internukleosidbrücke (B) des Oligonukleotids erfolgen. Die Anbindung kann zum Beispiel aber auch über nichtnukleotidische Bausteine, z.B. Fall (D) erfolgen. Diese Beispiele sind in Abbildung 3 dargestellt.

10

Die genannten Modifikationen können entsprechend natürlich auch auf länger Polynukleotide und soweit geeignet Mono- bzw. Dinukleotide bzw. -nukleoside angewendet werden.

15

Die Oligonukleotide haben beispielsweise eine Länge von 8 bis 50 Nukleotiden, vorzugsweise 10-20 Nukleotide. Geeignet sind aber auch Oligonukleotide längere Oligo- bzw. Polynukleotide, beispielsweise mit einer Länge von 50 bis 10000 Nukleotiden, vorzugsweise 100 bis 1000 Nukleotiden, die gegebenenfalls auch doppelsträngig vorliegen können.

20

Die Oligonukleotide können jede beliebige Sequenz aufweisen. Abhängig von dem ausgewählten Target, d.h. falls das Target eine Nukleinsäure ist, in Abhängigkeit von dessen Sequenz oder falls das Target ein Protein ist, in Abhängigkeit von der Nukleinsäuresequenz, die für dieses Target-Protein kodiert, wird die Sequenz des Oligonukleotids ausgewählt bzw. designed. Ist beispielsweise das Target ein Virus, z.B. CMV, HIV, HSV-1, HSV-2, Influenza, VSV, Hepatitis B oder Papilloma Virus, dann kann das Oligonukleotid z.B. eine der folgenden Sequenzen haben:

25

30

a) gegen CMV

SEQ ID NO. 12

5'-G C G T T T G C T C T T C T T G C G

b) gegen HIV, z. B.

SEQ ID NO. 13 5'-ACACCCCAATTCTGAAAATGG-3' oder

SEQ ID NO. 14 5'-AGGTCCCTGTTCTGGGCGCCA-3' oder

5 c) gegen HSV-1, z.B.

SEQ ID NO. 15 5'-GCGGGGCTCCATGGGGGTCG-3'

Das Target kann z.B. ein Protein sein, das an der Krebsentstehung beteiligt bzw. für das Krebswachstum verantwortlich ist. Beispiele für solche Targets sind:

- 10 1) Nucleare Onkoproteine wie beispielsweise c-myc, N-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, PCNA, p120;
- 2) Cytoplasmische/Membran-assoziierte Onkoproteine wie beispielsweise EJ-ras, c-Ha-ras, N-ras, rrg, bcl-2, cdc-2, c-raf-1, c-mos, c-src, c-abl, c-ets;
- 3) Zelluläre Rezeptoren wie beispielsweise EGF-Rezeptor, Her-2, c-erbA, VEGF-
- 15 Rezeptor (KDR-1), Retinoid-Rezeptoren, Protein-Kinase regulatorische Untereinheit, c-fms, Tie-2, c-raf-1 Kinase, PKC-alpha, Protein Kinase A (R1 alpha);
- 4) Cytokine, Wachstumsfaktoren, Extrazelluläre Matrix wie beispielsweise CSF-1, IL-6, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, bFGF, VEGF, Myeloblastin, Fibronectin.

20 Oligonukleotide, die gegen solche Targets gerichtet sind können beispielsweise folgende Basen-Sequenz haben:

a) gegen c-Ha-ras, z. B.

SEQ ID NO. 16 5'-CAGCTGCAACCCAGC-3' oder

SEQ ID NO. 17 5'-TATTCCGTCAT-3' oder

SEQ ID NO. 18 5'-TTCCGTCATCGCTCCTCAGGGG-3'

b). bFGF, z.B.

SEQ ID NO. 19 5'-GGCTGCCATGGTCCC-3'

30

c) c-myc, z.B.

SEQ ID NO. 20 5'-GGCTGCTGGAGCGGGGACAC-3'

SEQ ID NO. 21 5'-AACGTTGAGGGGCGAT-3'

d) c-myb, z.B.

SEQ ID NO. 22 5'-GTGCCGGGGTCTTCGGGC-3'

e) c-fos, z.B.

5 SEQ ID NO. 23 5'-CGAGAACATCATCGTGG-3'

SEQ ID NO. 24 5'-GGAGAACATCATGGTCGAAAG-3'

SEQ ID NO. 25 5'-CCCGAGAACATCATGGTCGAAAG-3'

SEQ ID NO. 26 5'-GGGGAAAGCCCGGCAAGGGG-3'

10 f) p120, z.B.

SEQ ID NO. 27 5'-CACCCGCCTTGGCCTCCAC-3'

g) EGF-Rezeptor, z.B.

SEQ ID NO. 28 5'-GGGACTCCGGCGCAGCGC-3'

15 SEQ ID NO. 29 5'-GGCAAACCTTTCTTTTCCTCC-3'

h) p53 Tumorsuppressor, z.B.

SEQ ID NO. 30 5'-GGGAAGGAGGAGGATGAGG-3'

SEQ ID NO. 31 5'-GGCAGTCATCCAGCTTCGGAG-3'

20

i) bcl-2

SEQ ID NO. 32 5'-TCTCCAGCGTGCGCCAT

k) VEGF

2 SEQ ID NO. 33 5'-GCGCTGATAGACATCCATG

SEQ ID NO. 34 3'-CCAGCCCGGAGG-5', 5'-GGAGGCCCGACC-3'

SEQ ID NO. 35 3'-CGGAGGCTTTGG-5', 5'-GGTTTCGGAGGC-3';

SEQ ID NO. 36 3'-GATGGAGGTGGT-5', 5'-TGGTGGAGGTAG-3'

SEQ ID NO. 37 3'-GGAGGTGGTACG-5', 5'-GCATGGTGGAGG-3'

30 SEQ ID NO. 38 3'-GGTGGTACGGTT-5', 5'-TTGGCATGGTGG-3'

SEQ ID NO. 39 3'-CACCAGGGTCCG-5', 5'-GCCTGGGACCAC-3'

- SEQ ID NO. 40 3'-CCAGGGTCCGAC-5', 5'-CAGCCTGGGACC-3'
 SEQ ID NO. 41 3'-AGGGTCCGACGT-5', 5'-TGCAGCCTGGGA-3'
 SEQ ID NO. 42 3'-GGGTCCGACGTG-5', 5'-GTGCAGCCTGGG-3'
 SEQ ID NO. 43 3'-GGTCCGACGTGG-5', 5'-GGTGCAGCCTGG-3'
 5 SEQ ID NO. 44 3'-CCGACGTGGGTA-5', 5'-ATGGGTGCAGCC-3'
 SEQ ID NO. 45 3'-GTAGAAGTTCGG-5', 5'-GGCTTGAAGATG-3'
 SEQ ID NO. 46 3'-ACGCCCCCGACG-5', 5'-GCAGCCCCCGCA-3'
 oder
 SEQ ID NO. 47 3'-CCCCCGACGACG-5', 5'-GCAGCAGCCCCC-3'

10

l) c-raf Kinase

SEQ ID NO. 48 5'-TCCCGCCTGTGACATGCATT

15 m) PKC-alpha

SEQ ID NO. 49 5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTTCA

n) Protein Kinase A

SEQ ID NO. 50 5'-GCGTGCCTCCTCACTGGC

20

Ist das Target ein Integrin oder ein Zell-Zell-Adhäsionsrezeptor, wie z.B. VLA-4, VLA-2, ICAM, VCAM oder ELAM, dann kann das Oligonukleotid beispielsweise eine der folgenden Sequenzen haben:

25 a) VLA-4, z.B.

SEQ ID NO. 51 5'-GCAGTAAGCATCCATATC-3' oder

b) ICAM-1, z.B.

SEQ ID NO. 52 5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA

30 SEQ ID NO. 53 5'-CCCCCACCCTTCCCCTCTC-3'

SEQ ID NO. 54 5'-CTCCCCCACCCTTCCCCTC-3'

SEQ ID NO. 55 5'-GCTGGGAGCCATAGCGAGG-3'

c) ELAM-1, z. B.

SEQ ID NO. 56 5'-ACTGCTGCCTCTTGTCTCAGG-3'
 SEQ ID NO. 57 5'-CAATCAATGACTTCAAGAGTTTC-3'

5

d) Integrin alpha(V)

SEQ ID NO. 58 5'-GCGGCGGAAAAGCCATCG

10 Ist das Target ein Protein, das für Proliferation oder Migration verantwortlich bzw. an diesen/diesem Prozess(en) beteiligt ist, wie beispielsweise:

1) Nucleare Transaktivator-Proteine und Cycline wie beispielsweise c-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, Cycline und cdc2-Kinase;

2) Mitogene oder Wachstumsfaktoren wie beispielsweise PDGF, bFGF, VEGF, EGF,

15 HB-EGF und TGF-β;

3) Zelluläre Rezeptoren wie beispielsweise bFGF-Rezeptor, EGF-Rezeptor und PDGF-Rezeptor;

dann kann das Oligonukleotid beispielsweise eine der folgenden Basen-Sequenzen haben:

20

a) c-myb

SEQ ID NO. 59 5'-GTGTCGGGGTCTCCGGGC-3'

b) c-myc

2 SEQ ID NO. 60 5'-CAGTTGAGGGGCAT-3'

c) cdc2-Kinase

SEQ ID NO. 61 5'-GTCTTCCATAGTTACTCA-3'

30 d) PCNA (proliferating cell nuclear antigen of rat)

SEQ ID NO. 62 5'-GATCAGGCGTGCCCTCAA-3'.

Ist das Target z.B. ein Adenosin-A1-Rezeptors, Adenosin-A3-Rezeptors, Bradikinin-Rezeptors oder IL-13, ist beispielsweise die Basen-Sequenz

SEQ ID NO. 63

5'-GATGGAGGGCGGCATGGCGGG

möglich.

5 Folgende Oligonukleotide (5'→3') wurden hergestellt:

	ON1: 5'-d(G*C G A C*G C*C A T*G A C*G*G)	SEQ ID NO. 1
	ON2: 5'-d(C*G A C*G C*C A T*G*A*C)	SEQ ID NO. 2
	ON3: 5'-d(A*T*G A C*G G A A*T*T*C)	SEQ ID NO. 3
10	ON4: 5'-d(T A T T C C G T C A T)	SEQ ID NO. 4
	ON5: 5'-(dA) ₂₀	SEQ ID NO. 5
	ON6: 5'-(dA) ₅₀	SEQ ID NO. 6
	ON7: 5'-(dA) ₈₀	SEQ ID NO. 7
	ON8: 5'-T*T*C C*A T*G G*T G*G*C	SEQ ID NO. 8
15	ON9: 5'-T*T*C A*C T*G T*G G*G*C	SEQ ID NO. 9
	ON10: 5'-T*G*G C*G C*C G*G G*C*C	SEQ ID NO. 10
	ON11: 5'-T*G*C C*G G*C C*G G*G*C	SEQ ID NO. 11

20 wobei * die Positionen angibt, an denen eine Phosphodiester Brücke durch eine Phosphorothioat-Internukleosidbrücke ersetzt worden ist.

Diese Sequenzen wurden zu den folgenden Konjugaten (KO)umgewandelt:

25	KO_1:	F3-Li1-ON1
	KO_2:	F0-Li1-ON1
	KO_3:	F3-Li1-ON2
	KO_4:	F0-Li1-ON2
	KO_5:	F3-Li1-ON3
30	KO_6:	F9-Li1-ON3
	KO_7:	F2-Li-1ON3
	KO_8:	F0-Li1-ON3
	KO_9:	F3-Li1-ON3-Rhodamin

	KO_10:	F9-Li1-ON3-Rhodamin
	KO_11:	F6-Li1-ON3-Rhodamin
	KO_12:	F0-Li1-ON3-Rhodamin
	KO_13:	F3-Li1-ON4
5	KO_14:	F3-Li1-ON5
	KO_15:	F3-Li1-ON6
	KO_16:	F3-Li1-ON7
	KO_17:	F3-Li1-ON8
	KO_18:	F3-Li1-ON9
10	KO_19:	F3-Li1-ON10
	KO_20:	F3-Li1-ON11
	KO_21:	F7-Li1-ON3

wobei

- 15 „F1 bis F11“ Aryl-Reste der Formeln F1 bis F11 bedeuten (z.B. Abb. 2);
 "Li1" ein 6-Aminohexylphosphat-Rest ist, der an das 5'-Ende des Oligonukleotids
 gebunden ist (z.B. Abbildung s. Anlage 4);
 "ON1 bis ON11" die beschriebenen Oligonukleotide der Sequenzen SEQ ID NO.1
 bis SEQ ID NO.11 bedeuten;
 20 und "Rhodamin" eine neben Fluorescein nachweisbare Rhodamin-Markierung am 3'-
 Ende des Oligonukleotids ist.

- Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren zur Herstellung der
 erfindungsgemäßen Konjugate. Die Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung
 25 eines Konjugats, daß ein zu transportierendes Molekül und mindestens einen Aryl-
 Rest, vorzugsweise der Formeln I oder II enthält, wobei
 a) ein zu transportierendes Molekül, das eine reaktive Funktion an der Position
 enthält, an die der Aryl-Rest gebunden werden soll, hergestellt wird; und
 b) ein Arylrest hergestellt wird und
 30 c) das zu transportierende Molekül mit dem Aryl-Rest zum Konjugat umgesetzt wird.

Vorzugsweise ist die reaktive Funktion eine Aminogruppe, Mercaptogruppe,
 Chloracetylgruppe, Isocyanatgruppe, Isothiocyanatgruppe, Carbonsäuregruppe, N-
 Hydroxysuccinimidgruppe oder eine Carbonsäurechloridgruppe. Die Umsetzung des

zu transportierenden Moleküls mit dem Aryl-Rest wird bei einem pH-Wert $\leq 7,5$ durchgeführt; vorzugsweise bei einem pH-Wert $\leq 7,3$, besonders bevorzugt bei einem pH-Wert von 7,0 oder einem niedrigeren pH-Wert, beispielsweise einem pH-Wert < 7 , vorzugsweise pH-Wert $\leq 6,5$ durchgeführt wird. Bei diesen

- 5 Kupplungsreaktionen müssen alle anderen reaktiven Gruppen mit dem Fachmann bekannten Schutzgruppen vor der Reaktion geschützt werden.

In einer besonderen Ausführungsform der Verfahren ist das zu transportierende Molekül ein Polynukleotid, Oligonukleotid oder Mononukleotid.

- 10 Die Verfahren zu Herstellung beinhalten, daß in einem ersten Schritt das zu transportierende Molekül hergestellt wird. In diesem Zusammenhang betrifft die Erfindung auch Verfahren zur Herstellung von Oligonukleotiden. Die Oligonukleotide können mit Hilfe verschiedener bekannter, chemischer Verfahren, z.B. wie in Eckstein, F. (1991) "Oligonukleotides and Analogues, A Practical Approach", IRL Press, Oxford beschrieben, hergestellt werden. Die Oligonukleotide können auch durch Verfahren hergestellt werden, die gegebenenfalls einen oder mehrere enzymatische Schritte enthalten. Die Herstellung von Oligonukleotid-Konjugaten ist prinzipiell in der Literatur beschrieben (J. Goodchild, Bioconjugate Chem. 1 (1990) 165; S. Beaucage and R. Iyer, Tetrahedron 49 (1993) 1925; S. Agrawal Methods in
- 15 20 Molecular Biology Vol. 26 "Protocols for oligonucleotide Conjugates" (1994) Humana Press).

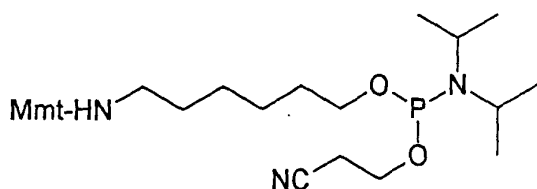
Bei der Synthese der Oligonukleotid-Konjugate gemäß Formel I ist jedoch darauf zu achten, daß diese sich im alkalischen Medium zersetzen können. Daher ist

- 25 beispielsweise mit Hilfe der gängigen Methoden keine Synthese von FDA-markierten Oligonukleotide an einem Oligonukleotid-Synthesizer möglich, da die Estergruppen der FDA-Gruppe bei der Ammoniakbehandlung, die zum Abspalten des Oligonukleotids vom Träger und der Abspaltung der Aminoschutzgruppen der heterozyklischen Basen notwendig ist, bereits hydrolysiert würden.
- 30 Daher wird das Oligonukleotid zunächst in entschützter Form als Vorstufe hergestellt und im letzten Schritt mit der Gruppe gemäß Formel I kondensiert (Abbildung 5). Die Vorstufe des Oligonukleotids besitzt eine reaktive bzw. aktivierbare Funktion, die anschließend nach dem Fachmann bekannten Methoden mit einem Reagenz, das

die erfindungsgemäße Gruppe gemäß Formel I enthält, derivatisiert wird. Als reaktive bzw. aktivierbare Funktionen kommen beispielsweise Amino-, Mercapto-, Chloracetyl, Iso(thio)cyanat- und Carbonsäurefunktionen in Betracht.

- Besonders leicht sind sogenannte Amino-Linker mit Hilfe kommerziell erhältlicher Reagenzien in Oligonukleotide einzuführen. Die Aminolinker-Oligonukleotide werden dann beispielsweise mit reaktiven Reagenzien, die eine Gruppe gemäß der Formel I enthalten, umgesetzt. Solche reaktiven Reagenzien sind beispielsweise die entsprechenden Isothiocyanate. Die Gruppe gemäß Formel I ist in diesem Falle über eine Thioharnstoff-Funktion verknüpft (Anlage 4). Andere reaktive Reagenzien sind beispielsweise die Carbonsäurechloride. Milde reaktive Reagenzien sind beispielsweise die N-Hydroxysuccinimide der entsprechenden Carbonsäuren. Aktivierbare Reagenzien sind beispielsweise entsprechende Carbonsäuren, die sich mit Peptid-Kupplungsreagenzien wie HBTU, TBTU oder TOTU kuppeln lassen. In diesem Fall ist die Gruppe gemäß Formel I über eine Amidfunktion-Funktion verknüpft. Im Prinzip kann die Einführung der erfindungsgemäßen Gruppen der Formel I an beliebigen Positionen des Oligonukleotids erfolgen. Bevorzugt sind die in Abbildung 3 gezeigten Positionen.

- Die Synthese der modifizierten Oligonukleotide erfolgte durch Aufbau der Oligonukleotid-Kette nach Standardmethoden, wie der Festphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode, und Derivatisierung des 5'-Endes mit dem kommerziell erhältlichen 5'-Amino-Modifier C6 (z.B. Firma Eurogentec, Seraing, Belgien).



5'-Amino-Modifier C6 (Mmt = 4-Monomethoxytrityl)

- Nach Abspaltung des Oligonukleotid-Derivates vom Träger und Entschützung aller basenlabilen Schutzgruppen durch Behandlung mit Ammoniak, wird die Monomethoxytritylgruppe durch Behandlung mit 80% Essigsäure bei

Umgebungstemperatur abgespalten. Man erhält ein 5'-Aminohexylphosphat-modifiziertes Oligonukleotid. Die Aminofunktion dieses Oligonukleotid-Derivats wird dann mit FDA-Isothiocyanat in 0.2 M Triethylammoniumbicarbonat Puffer (TBK-Puffer) pH 7 / DMF umgesetzt. Bereits nach etwa zwei bis drei Stunden war das

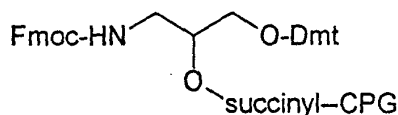
5 Aminolinker-Oligonukleotid komplett zum gewünschten FDA-Derivat umgesetzt (Abbildung 4). Umsetzungen mit Fluorescein-isothiocyanat werden normalerweise bei pH 8 durchgeführt. Bei diesem pH-Wert wird allerdings das Diacetat der FDA-Gruppe hydrolysiert.

Natürlich können auch andere Aminolinker-Reagenzien eingesetzt werden, wie

10 beispielsweise der 5'-Amino-Modifizier C3, 5'-Amino-Modifizier C12, 5'-Amino-Modifizier 5 oder 5'-Thiol-Modifizier C6 (alle von der Firma Eurogentec).

Durch den Einsatz von 3'-Amino-Modifizier-Festphasen, wie beispielsweise 3'-Amino-Modifizier C3 CPG (Firma Eurogentec) können Oligonukleotid-Derivate mit einer 3'-

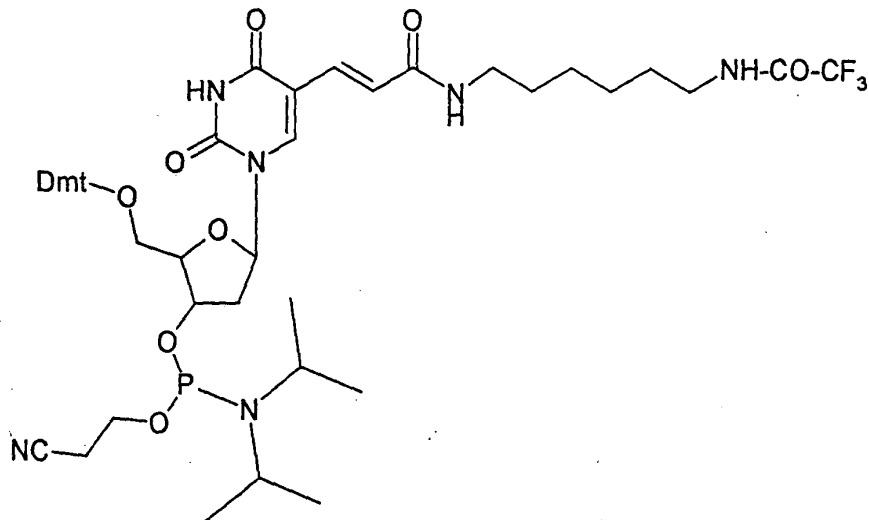
15 Aminoalkyl-Gruppe hergestellt werden, die anschließend mit FDA-isothiocyanat zur Reaktion gebracht werden. man erhält ein Oligonucleotid-Derivat, das die erfindungsgemäße Gruppe der Formel I am 3'-Ende gebunden hält.



3'-Amino-Modifizier C3 CPG (Fmoc = Fluorenylmethoxycarbonyl)

20 Zur Einführung des Konjugates an der heterocyclischen Base des Nucleosids kann man ein entsprechendes Amino-Modifizier C6 dT (Firma Eurogentec), das sich von Thymidin ableitet, in der Synthese anstelle eines normalen Phosphoramidit-Bausteins einsetzen. Am Ende der Oligonukleotid-Syhtese wird die Trifluoracetyl-Schutzgruppe durch Ammoniakbehandlung abgespalten und die freie Aminofunktion

25 in Lösung mit FDA-isothioacyanat zur Reaktion gebracht.



5 Amino-Modifier C6 dT

In ähnlicher Weise können die erfindungsgemäßen Gruppen der Formel I in beliebige Positionen der Oligonukleotide eingeführt werden. Es ist leicht ersichtlich, daß auch eine mehrfache Einführung von gleichen oder unterschiedlichen Gruppen möglich ist.

10

In Verfahren zur Herstellung von Konjugaten, in denen das zu transportierende Molekül eine PeptidNukleinsäure (PNAs) ist, kann beispielsweise die primäre Aminofunktion der Aminoethyl-Gruppe mit FDA-isothiocyanat umgesetzt werden.

1

In Verfahren zur Herstellung von Konjugaten, in denen das zu transportierende Molekül ein Polypeptid ist, können beispielsweise der Amino-Terminus des Polypeptids oder die Aminofunktionen von Lysin-Seitenkette für eine Umsetzung mit FDA-isothiocyanat verwendet werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch die Verwendungen der Konjugate, insbesondere Verwendungen, die durch die beschriebenen vorteilhaften Eigenschaften der Konjugate begründet sind. Eine besondere Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung der Konjugate zum Transport eines Moleküls über eine biologische Membran. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von Aryl-

20

Resten, vorzugsweise der Formeln I oder II, zum Transport eines Moleküls, an das dieser Aryl-Rest gebunden ist, zum Transport dieses Moleküls über eine biologische Membran. Vorzugsweise ist die biologische Membran Bestandteil einer Zelle, eines Vesikels oder einer Organelle.

- 5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Verfahren zum Transport eines Moleküls über eine Membran, wobei
- a) ein Konjugat hergestellt wird, bei dem das zu transportierende Molekül an mindestens einen Aryl-Rest der Formel I oder II gebunden ist, und
 - b) das Konjugat mit der Membran inkubiert wird.

10

Insbesondere, Verfahren zum Transport eines Moleküls in eine Zelle, wobei

- a) ein Konjugat hergestellt wird, bei dem das zu transportierende Molekül an mindestens einen Aryl-Rest der Formeln I oder II gebunden ist, und
 - b) das Konjugat mit der Zelle inkubiert wird, woraufhin
- 15 c) das Konjugat in die Zelle transportiert wird, ohne daß der Aryl-Rest abgespalten wird.

Dies betrifft insbesondere Verfahren, in denen die Zelle eine eukaryotische oder eine prokaryotische Zelle, beispielsweise eine Bakterienzelle, Hefezelle oder eine

- 20 Säugetierzelle, vorzugsweise eine humane Zelle ist. In besonderen Ausführungsformen ist die Zelle eine pathologisch veränderte Zelle, z.B. eine Tumorzelle.

- Die verbesserte zelluläre Aufnahme der Konjugate wurde nicht nur bei Zellen von Säugetieren beobachtet, sondern auch für andere Eukaryoten und sogar für Prokaryoten nachgewiesen.

- Die erfindungsgemäßen Konjugate wurden mikroskopisch auf die Aufnahme in lebende Zellen untersucht. Zunächst wurden die FDA-markierten Oligonukleotide auf
- 30 KO_1 und KO_3 Zellgängigkeit untersucht. Als dem Stand der Technik bekannte Verbindungen wurden die entsprechenden Fluorescein-markierten Oligonukleotide KO_2 und KO_4 eingesetzt. Alle untersuchten vitalen tierischen Zellkulturen nahmen KO_1 und KO_3 (FDA-Konjugate) innerhalb von 5 bis 10 Minuten auf, während

KO_2 und KO_4 (Fluorescein-Konjugate) nach dieser Zeit nicht in vitalen Zellen nachweisbar war (Tabelle 1)

Obwohl die Aufnahme in Bakterien und Hefe viel langsamer erfolgt als in in
 5 Säugerzellen, hat nach zwei Stunden doch eine Aufnahme der erfindungsgemäßen Oligonukleotide in einen Teil der Zellen stattgefunden, während die normalen Fluorescein-markierten Oligonukleotide unter diesen Bedingungen nicht aufgenommen werden. Es ist erstaunlich, daß im Prinzip alle bislang untersuchten Organismen die erfindungsgemäßen Oligonukleotide besser als bekannte
 10 Oligonukleotid-Derivate aufgenommen haben. Die Organismen umfassen unter anderem tierische Zellen, Flagellaten, Hefen, Pilze und Bakterien (Tabelle 3).

Es zeigte sich ferner, daß Krebszellen die Oligonukleotide besonders gut aufnehmen. Daher ist die Anwendung der erfindungsgemäßen Oligonukleotide
 15 besonders für die Tumorthherapie geeignet. Das FDA-markierte Antisense Oligonukleotid KO_1, das gegen eg5 gerichtet ist, hemmte die Proliferation von A549 Zellen bereits durch Zugabe ins Medium, während das entsprechende unmodifizierte Antisense Oligonucleotid ON 1 und das Fluorescein-markierte Oligonukleotid KO_2 nur nach Formulierung mit Penetrationsenhancern wie
 20 CellFectin die Proliferation der Krebszellen hemmten.

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Konjugaten, in denen das zu transportierende Molekül ein Oligonukleotid ist, zur Hybridisierung mit
 25 einzelsträngigen und/oder doppelsträngigen Nukleinsäuren, beispielsweise DNA (z.B. Gene, cDNA) und/oder RNA (z.B. pre-mRNA, mRNA). Diese Konjugate können auch sequenzspezifisch an intrazelluläre Proteine wie Enzyme, beispielsweise Polymerasen oder Telomerasen, oder an Transkriptionsfaktoren binden. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung solcher Konjugate zur Modulation sowie zur ganzen oder teilweisen Inhibition der Expression von bestimmten Target-Genen,
 30 beispielsweise zur ganzen oder teilweisen Inhibition der Transkription und/oder der Translation. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung solcher Konjugate als Antisense Oligonukleotide, Ribozyme, Sense Oligonukleotide, Tripelhelix-bildende Oligonukleotide, Chimera-plasten und/oder Decoy-Oligonukleotide. Darüber hinaus können diese Konjugate als Hilfsmittel in der Molekularbiologie verwendet werden.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der Oligonukleotide als Arzneimittel und/oder Diagnostikum bzw. die Verwendung der Oligonukleotide zur Herstellung von Arzneimitteln und/oder Diagnostika. Insbesondere können die Oligonukleotide in
 5 Arzneimitteln, die zur Prävention und/oder Behandlung von Krankheiten, die mit der Expression bzw. einer Überexpression bestimmter Gene einhergehen, eingesetzt werden. Weiterhin können die Oligonukleotide für die Diagnose bzw. Früherkennung solcher Krankheiten eingesetzt werden. Da die Zellgängigkeit der
 erfindungsgemäßen Oligonukleotide sehr gut ist, können diese für die in vivo
 10 Diagnostik, beispielsweise zur in situ Hybridisierung an ganzen Organen oder am intakten Organismus, eingesetzt werden.

Gegenstand der Erfindung sind auch Arzneimittel, die ein oder mehrere
 erfindungsgemäße Konjugate enthalten. Gegenstand der Erfindung ist auch ein
 15 Diagnostikum, daß ein oder mehrere erfindungsgemäße Konjugate enthält.
 Gegenstand der Erfindung ist auch ein Test-Kit, der ein oder mehrere
 erfindungsgemäße Konjugate enthält.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der Oligonucleotide zur Detektion,
 20 Separation und Amplifikation von Nucleinsäuren und deren Analoga. Die Konjugate eignen sich besonders zum Nachweis von Nucleinsäuren in Zellen, insbesondere in lebenden Zellen. Diese Zellen können humanen oder tierischen Ursprungs sein.
 Besonders eignen sich die Konjugate auch für die in Tabelle 3 aufgeführten
 Organismen, insbesondere zum Nachweis von pathogenen Organismen.
 25 Die erfindungsgemäßen Oligonucleotide können in bekannte technische Varianten der Amplifikation von Nucleinsäuren eingesetzt werden, insbesondere in die LMPCR (ligation-mediated Polymerase Chain Reaction), in den "Invader Assay "
 (Warenzeichen, Third Wave technologies, Inc., Wisconsin), im TaqMan System
 (Warenzeichen) und im Multiplex Genotyping. Vorteilhaft ist auch die Verwendung
 30 der Oligonukleotide zur Amplifikation von Nukleinsäuren mit Hilfe des Light-Cyclers, das eine Echtzeit- Bestimmung der Amplifikation erlaubt. Die Detektion nach dem Prinzip der molekularen "Beacons", bei denen der Fluoreszenzfarbstoff im ungebundenen Zustand nicht fluoresziert, weil er durch eine zweite Gruppe im Oligomer gequencht wird, ist eine weitere Einsatzmöglichkeit der

erfindungsgemäßen Oligonukleotide. Beispielsweise kann ein FDA-Derivat (z.B. am 5'-Ende des Oligonukleotids) mit einem Dabcyl-Rest (z.B. am 3'-Ende konjugiert) kombiniert werden, der auch nach Umwandlung des FDA-Derivats in das Fluorescein-Derivat das Fluoreszenzsignal im ungebundenen Zustand quencht.

- 5 Diese FDA-modifizierten Beacons würden erst nach Aufnahme in die Zelle und Hybridisierung an die Ziel-mRNA ein Fluoreszenzsignal aussenden.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der Oligonukleotide bzw. von Arzneimitteln, die diese Oligonukleotide enthalten, zur Behandlung von Krankheiten, bei denen definierte Gene durch Überexpression ursächlich bzw. beteiligt ist.

- 10 Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung können beispielsweise zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Viren hervorgerufen werden, beispielsweise durch CMV, HIV, HSV-1, HSV-2, Influenza, VSV, Hepatitis B oder Papilloma Viren, verwendet werden. Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung eignen sich beispielsweise auch zur Behandlung von Krebs. Die Arzneimittel der vorliegenden

- 15 Erfindung eignen sich beispielsweise ferner zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Integrine oder Zell-Zell-Adhäsionsrezeptoren beeinflusst werden, beispielsweise durch VLA-4, VLA-2, ICAM, VCAM oder ELAM. Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung eignen sich beispielsweise auch zur Verhinderung der Restenose, zur Behandlung von Vitiligo und anderen Depigmentierungskrankheiten
20 bzw. Depigmentierungsstörungen (z.B. der Haut, Haare, Augen) beispielsweise Albinismus und Psoriasis, von Asthma.

Die Arzneimittel betreffen z.B. pharmazeutische Präparate, die man a) oral, z.B. in Form von Tabletten, Dragees, Hart- oder Weichgelatine kapseln, Lösungen,

- 25 Emulsionen oder Suspensionen, b) rektal, z.B. in Form von Suppositorien oder c) parenteral, z.B. in Form von Injektionslösungen verabreichen kann. Für die

Herstellung der Arzneimittel können die Konjugate z.B. in therapeutisch inerten organischen und/oder anorganischen Trägern verarbeitet werden; beispielsweise können als Träger für Tabletten, Dragees und Hartgelatine kapseln Laktose,

- 30 Maisstärke oder Derivate davon, Talg und Stearinsäure oder Salze davon verwendet werden. Als Träger für Lösungen sind Wasser, Polyole, Saccharose, Invertzucker und Glucose, für Injektionslösungen sind Wasser, Alkohole, Polyole, Glycerol und pflanzliche Öle, für Suppositorien sind pflanzliche und gehärtete Öle, Wachse, Fette und halbflüssige Polyole geeignet. Die Arzneimittel können zudem

Konservierungsmittel, Lösemittel, Stabilisierungsmittel, Netzmittel, Emulgatoren, Süßstoffe, Farbstoffe, Geschmacksmittel, Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks, Puffer, Überzugsmittel, Antioxidantien, sowie ggf. andere therapeutische Wirkstoffe enthalten. Vorzugsweise werden die Arzneimittel topisch appliziert oder

5 lokale appliziert wie beispielsweise mit Hilfe eines Katheters oder inhaliert, oder per Injektionen bzw. Infusionen verabreicht. Zur Injektion wird das Konjugat in einer flüssigen Lösung, vorzugsweise in einem physiologisch annehmbaren Puffer, wie z.B. Hank's Lösung oder Ringer's Lösung, formuliert. Das Konjugat kann aber auch in fester Form formuliert werden und vor dem Gebrauch gelöst oder suspendiert

10 werden. Die für die systematische Verabreichung bevorzugten Dosierungen betragen ca. 0,01 mg/kg bis ca. 50 mg/kg Körpergewicht und Tag.

Die Konjugate und/oder deren physiologisch verträglichen Salze können am Tier, bevorzugt am Säugetier, und insbesondere am Menschen als Arzneimittel für sich allein, in Mischungen untereinander oder in Form von pharmazeutischen

15 Zubereitungen verabreicht werden, die eine topische, perkutane, parenterale oder enterale Anwendung gestatten und die als aktiven Bestandteil eine wirksame Dosis mindestens eines Konjugats, neben üblichen pharmazeutisch einwandfreien Träger- und Zusatzstoffen enthalten. Die Zubereitungen enthalten normalerweise etwa 0,1 bis 90 Gew.-% der therapeutisch wirksamen Verbindung. Zur Behandlung von

20 Hautkrankheiten, wie beispielsweise Psoriasis oder Vitiligo wird eine topische Anwendung, z.B. in Form von Salben, Lotionen oder Tinkturen, Emulsionen, Suspensionen bevorzugt. Die Herstellung der Arzneimittel erfolgt in an sich bekannter Weise, (z. B. Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publ. Co., Easton, PA.), wobei pharmazeutisch inerte anorganische und/oder organische

25 Trägerstoffe verwendet werden. Für die Herstellung von Pillen, Tabletten, Dragees und Hartgelatine kapseln kann man z.B. Lactose, Maisstärke und/oder Derivate derselben, Talk, Stearinsäure und/oder deren Salze etc. verwenden. Trägerstoffe für Weichgelatine kapseln und/oder Suppositorien sind z.B. Fette, Wachse, halbfeste und flüssige Polyole, natürliche und/oder gehärtete Öle etc. Als Trägerstoffe für die

30 Herstellung von Lösungen und/oder Sirupen eignen sich z.B. Wasser, Saccharose, Invertzucker, Glukose, Polyole etc. Als Trägerstoffe für die Herstellung von Injektionslösungen eignen sich Wasser, Alkohole, Glycerin, Polyole, pflanzliche Öle etc. Als Trägerstoffe für Mikrokapseln, Implantate und/oder Rods eignen sich Mischpolymerisate aus Glykolsäure und Milchsäure. Darüber hinaus sind

Liposomenformulierungen, die dem Fachmann bekannt sind, geeignet (N. Weiner, Drug Develop Ind Pharm 15 (1989) 1523; "Liposome Dermatics, Springer Verlag 1992), beispielsweise HVJ-Liposomen (Hayashi, Gene Therapy 3 (1996) 878).

- 5 Ein Arzneimittel kann neben den Wirk- und Trägerstoffen noch Zusatzstoffe, wie z.B. Füllstoffe, Streck-, Spreng-, Binde-, Gleit-, Netz-, Stabilisierungs-, Emulgier-, Konservierungs-, Süß-, Färbe-, Geschmacks- oder Aromatisierungs-, Dickungs-, Verdünnungsmittel, Puffersubstanzen, ferner Lösungsmittel und/oder Lösungsvermittler und/oder Mittel zur Erzielung eines Depoteffekts, sowie Salze zur
- 10 Veränderung des osmotischen Drucks, Überzugsmittel und/oder Antioxidantien enthalten. Sie können auch zwei oder mehrere verschiedene Oligonukleotide und/oder deren physiologisch verträgliche Salze enthalten sowie ferner neben mindestens einem Oligonukleotid einen oder mehrere andere therapeutisch wirksame Stoffe. Die Dosis kann innerhalb weiter Grenzen variieren und ist in jedem
- 15 einzelnen Fall den individuellen Gegebenheiten anzupassen.

Abbildungen

Abbildung 1: Die Abbildung zeigt Beispiele für Aryl-Reste der Formel (I).

20

Abbildung 2 a und b : Die Abbildung zeigt Beispiele für Aryl-Reste der Formel (II).

Abbildung 3: Abbildung 3 zeigt verschiedene Beispiele (A, B, C, D, E, F, G) für eine Konjugation zwischen einem zu transportierenden Molekül (hier ein Oligonukleotid) und Aryl-Resten der Formel (I). „R“ steht für einen Rest der Formel (I); „B“ steht für eine in der heterozyklische Base.

25

Abbildung 4: Abbildung 4 zeigt eine Möglichkeit, ein erfindungsgemäßes Konjugat (hier bestehend aus FDA-isothiocyanat und Oligonukleotid) herzustellen.

30

Abbildung 5: Abbildung 5 zeigt den zeitlichen Verlauf der Aufnahme des Konjugats KO_5 in REH-Zellen aus dem Medium, wobei einmal Medium ohne Serum (◆) und einmal Medium mit Serum (■) verwendet wurde. Die Zellaufnahme wurde mit Hilfe von FACS bestimmt.

Abbildung 6: Abbildung Bestimmung der Zellaufnahme von KO_1 (FDA-Konjugat; ♦) und KO_2 (FITC-Oligomer; ▲) durch FACS-Messung. Die Anfangskonzentration an extrazellulärem Oligonukleotid-Konjugat betrug 1 µM; ○ und □ sind Kontrollen.

5

Beispiele

Beispiel 1: Oligonukleotidsynthese

10

Oligonukleotide wurden auf einem automatischen DNA Synthesizer (Applied Biosystems Model 380B oder 394) unter Anwendung der Standard Phosphoramidit-Chemie und Oxidation mit Jod synthetisiert (F. Eckstein, Ed "Oligonukleotides and Analogues, A Practical Approach", IRL Press, Oxford, 1991). Zur Einführung von

15

Phosphorthioat-Brücken in gemischten Phosphorothioaten und Phosphodiester Oligonukleotiden wurde anstelle von Jod mit TETD (Tetraethylthiuramdisulfid) oxidiert oder Beaucage's Reagenz oxidiert. Nach Abspaltung vom festen Träger (CPG oder Tentagel) und Entfernung der Schutzgruppen mit konz. NH₃ bei 55°C während 18h, wurden die Oligonukleotide zunächst durch Butanol-Fällung

20

(Sawadogo, Van Dyke, Nucl. Acids Res. 19 (1991) 674) gereinigt. Die Oligonukleotide wurden durch präparative Gelelektrophorese oder FPLC gereinigt. Anschließend wurde das Natriumsalz erhalten durch Ausfällung aus einer 0.5 M NaCl Lösung mit 2.5 Volumenteilen Ethanol.

25

Die Analyse der Oligonukleotide erfolgte durch

a) Analytische Gelelektrophorese in 20% Acrylamid, 8M Harnstoff, 454M Tris-borat Puffer, pH 7.0 und/oder

b) HPLC-Analyse: Waters GenPak FAX, Gradient CH₃CN (400ml), H₂O (1.6l), NaH₂PO₄ (3.1g), NaCl (11.7g), pH6.8 (0.1M an NaCl) nach CH₃CN (400ml), H₂O (1.6l), NaH₂PO₄ (3.1g), NaCl (175.3g), pH6.8 (1.5M an NaCl) und/oder

30

c) Kapillargelelektrophorese Beckmann Kapillare eCAP™, U100P Gel Column, 65 cm length, 100 mm I.D., window 15 cm from one end, Puffer 140 µM Tris, 360mM Borsäure, 7M Harnstoff und/oder

d) Elektrospray Massenspektroskopie

Die Analyse des Oligonukleotids ergab, daß dieses jeweils in einer Reinheit von größer 90%, meistens aber größer 95% vorlag.

5

Beispiel 2: Einführung eines 5'-Amino-Linkers in ein Oligonukleotid

Das Oligonukleotid wurde wie in Beispiel 1 beschrieben aufgebaut. Nach Kupplung
 10 des letzten Nukleotids wurde die Dimethoxytritylgruppe am 5'-Ende abgespalten. Die freie Hydroxylgruppe wurde mit dem kommerziell erhältlichen 5'-Amino-Modifizier C6 (Firma Eurogentec, Seraing, Belgien) unter Tetrazol-Katalyse umgesetzt, mit Jodwasser oxidiert. Dann wurde das Oligonukleotid durch Behandlung mit conc. Ammoniak bei 50°C über Nacht vom Träger gespalten und alle basenlabilen
 15 Schutzgruppen an den Internucleosid-Gruppen und den Aminiofunktionen der heterocyclischen Basen abgespalten. Im letzten Schritt wurde die Monomethoxytrityl-Schutzgruppe durch 3-stündige Behandlung mit 80%-iger Essigsäure bei Umgebungstemperatur abgespalten. Das resultierende Oligonukleotid wurde wie in Beispiel 1 beschrieben analysiert.

20

Beispiel 3: Konjugation des Amino-Linker Oligonukleotids mit FDA-Isothiocyanat

10 OD (260) des 5'-Amino-Linker Oligonukleotids aus Beispiel 2 wurden in 16 µl 0.2 M Triethylammoniumbicarbonat (TBK) Puffer gelöst und mit 125 µl
 25 Dimethylformamid (DMF) versetzt. Zu dieser Mischung gab man 1.5 mg FDA-Isothiocyanat zu und ließ diese dann 3 Stunden uner Lichtausschluß schütteln. Der Erfolg der Umsetzung wurde durch HPLC überprüft. danach wurden 2 µl conc. Essigsäure zugegeben und im Vakuum konzentriert. Anschließend wurde das Produkt durch eine Butanolfällung gereinigt. Mit Hilfe der ESI-Massenspektroskopie
 30 wurde das richtige Massengewicht festgestellt. Die Proben wurden stets bi pH kleiner 7 gehalten, damit keine Hydrolyse des aromatisierten Esters stattfand.

Beispiel 4: Synthese von KO_1 (5'-F3-G*CGAC*GC*CAT*GAC*G*G-3' ;F3 = FDA)

Das Oligonucleotid wurde ausgehend von einem CPG-Träger, der 1 µmol Desoxyguanosin über das 3'-Ende gebunden hielt, wie in Beispiel 1 beschrieben aufgebaut. An den mit * gekennzeichneten Positionen wurde die Oxidation mit

- 5 Dann wurde der 5'-Amino-Modifizierer C6 wie in Beispiel 2 beschrieben aufgekuppelt. Nach der Entschüttung mit conc. Ammoniak und 80% Essigsäure erhielt man 96 OD (260) des 5'-Aminolinker-G*CGAC*GC*CAT*GAC*G*G-3'.
10 OD (260) des 5'-Amino-Linker-Oligonucleotids wurden dann wie in Beispiel 3 beschrieben mit FDA-Isothiocyanat umgesetzt. Nach der Butanolfällung erhielt man
10 8.4 OD (260) des gewünschten FDA-markierten Oligonucleotids. ESI-MS für di-Na-Salz: 5395.93 (berechnet für di-Na: 5395.09)

Beispiel 5: Synthese von KO_13 (5'-F3-TATTCCGTCAT-3')

- 15 Das Oligonucleotid wurde ausgehend von einem CPG-Träger, der 1 µmol Thymidin über das 3'-Ende gebunden hielt, wie in Beispiel 1 beschrieben aufgebaut. Alle Oxidationen wurden mit Jodwasser durchgeführt. Dann wurde der 5'-Amino-Modifizierer C6 wie in Beispiel 2 beschrieben aufgekuppelt. Nach der Entschüttung mit conc. Ammoniak und 80% Essigsäure erhielt man 72 OD (260) des 5'-Aminolinker-
20 TATTCCGTCAT-3'. nach der Reinigung über ein präparatives Polyacrylamid-gel erhielt man 43 OD (260).
10 OD (260) des 5'-Amino-Linker-Oligonucleotids wurden dann wie in Beispiel 3 beschrieben mit FDA-Isothiocyanat umgesetzt. Nach der Butanolfällung erhielt man
9.1 OD (260) des gewünschten FDA-markierten Oligonucleotids. ESI-MS: 3934.1
25 (berechnet MW 3933.8).

Beispiel 6: Synthese von KO_21 (5'-F7-A*T*G A C*G G A A*T*T*C)

- Das Oligonucleotid wurde ausgehend von einem CPG-Träger, der 1 µmol N6-Benzoylcytidin über das 3'-Ende gebunden hielt, wie in Beispiel 1 beschrieben
30 aufgebaut. Alle Oxidationen wurden mit Jodwasser durchgeführt. Dann wurde der 5'-Amino-Modifizierer C6 wie in Beispiel 2 beschrieben aufgekuppelt. Nach der

Entschützung mit conc. Ammoniak und 80% Essigsäure erhielt man 145 OD (260) des 5'-Aminolinker-A*T*G A C*G G A A*T*T*C-3'.

10 OD (260) des 5'-Amino-Linker-Oligonucleotids wurden in 16 µl 0.2 M TBK-Puffer, 95 µl DMF gelöst und mit 30 µl des zuvor hergestellten Aktivesters der p-

- 5 Acetoxybenzoesäure umgesetzt. Die Herstellung des Aktivesters erfolgte durch Mischen von 50 µl 0.2 M p-Acetoxybenzoesäure mit 50 µl 0.3 M TBTU, jeweils in DMF, und einstündige Reaktion bei Umgebungstemperatur. Nach 4 Stunden Reaktion des Aminolinker-Oligonucleotids mit dem Aktivester gibt man 2µl halbkonzentrierte Essigsäure zu und konzentriert im Vakkum. Überschüssiges
- 10 Reagenz wurde durch eine Butanol-Fällung entfernt. Man erhielt 10.7 OD (260) des gewünschten Oligonucleotid-Konjugats. ESI-MS: 4109.2 (berechnet MW 4108.2).

Beispiel 7: Untersuchung der zellulären Aufnahme der Oligonucleotid-Konjugate:

- 15 Zur Untersuchung der Zellaufnahme wurden 1ml Zellsuspension in einer Bachofer-Kammer in Kulturmedium (oder nach Spülen in PBS bei Medien mit Eigenfluoreszenz) unter mikroskopischer Kontrolle mit 1ml einer 1 µmolaren Lösung des Oligonucleotid-Konjugates versetzt, wobei die Durchmischung mit der Pipette und durch Schütteln der Kammer erfolgte. Die Mikroskopie wurde mit Hilfe des Zeiss
- 20 Axiovert 135 TV Geräts (100 x Plan-Neofluar) im Phasenkontrast-Modus durchgeführt. Als Fluoreszenz-Filter dienten 09 (450-490/ FT 510/ LP 520) / HBO 59W Filter. Als Referenz wurde eine 2.4 µM Lösung von FDA (Aldrich Chem. Co, FW.416.39) in Acteon/PBS-Puffer (1: 1000; v:v) eingesetzt. Im Falle der FDA-Konjugate kann nach Aufnahme die Eigenfluoreszenz des durch Esterspaltung
- 25 entstandenen Fluorescein-Liganden verfolgt werden. Im Falle nichtfluoreszierender Liganden wie Acetoxynaphthalin-Carbonsäure wurde zusätzlich ein geeigneter Fluoreszenz-Label (FITC, Rhodamin, Cyaninfarbstoff Dy 3 oder Dy5) am Oligonucleotid angebracht. Eine Doppelmarkierung wie in KO_9 diente dazu zu zeigen, daß FDA nicht vom Oligonucleotid abgespalten wurde. Die einzelnen Proben
- 30 wurden 2 bis 120 Minuten nach Zugabe des Oligonucleotid-Konjugats bewertet. Bei Reh-Zellen war die Fluoreszenz nach 5 bis 10 min deutlich zu erkennen, bei K562 und adhaerenten Zellen sowie Insektenzellen erfolgte eine gewisse Zunahme noch bis zu 60 min nach Zugabe. Bei freilebenden Protozoen dauerte die Aufnahme bis

zu 1 h. Bei Hefen erfolgte die Aufnahme erst nach längerer Zeit und nicht homogen in alle Zellen. Pilzsporen nahmen FDA-Oligonucleotid-Konjugate besser auf als Hyphenzellen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 bis 3 zusammengefaßt.

5 Beispiel 8: Untersuchung der antiproliferativen Wirkung der Oligonucleotid-Konjugate.

Die REH-Zellen (humane prae-B Zell-Leukämie, DSM ACC 22) oder A549 Tumorzellen wurden in OptiMEM mit 10 % Fötalem Kälberserum (FKS; GIBCO-BRL) bei 37°C unter 5% CO₂ kultiviert. Am Tage vor dem Versuchsansatz wurden die Zellen so umgesetzt, daß nach 24 h eine Zellkonzentration von etwa 1×10^6 / ml erreicht werden konnte. Die Oligonucleotide bzw. deren Konjugate wurden in destilliertem Wasser als 1mM Stammlösungen gelöst und im Kühlschrank bei -20°C aufbewahrt. Die Zelleinsaat: (1×10^6 Zellen / ml in OptiMEM mit 10 % FKS) erfolgte in 24-Lochplatten. Zur Untersuchung wurden die Oligonucleotid-Derivate auf 2µM (in OptiMEM ohne FKS) verdünnt. Pro Loch wurden 100 µl Oligonucleotidlösung und 100 µl Zellsuspension gemischt (Gesamtvolumen 200µl / Loch; Oligokonzentration 1µM, Serumkonzentration 5 % FKS, Zellkonzentration $0,5 \times 10^6$ Zellen / ml). Nach 4 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden pro Loch 800 µl OptiMEM mit 11 % FKS zugegeben (Zellkonzentration jetzt 1×10^5 Zellen / ml, Serumkonzentration jetzt 10% FKS) und weiter inkubiert. Nach 96 h bei 37 °C und 5% CO₂ erfolgte die Messung der Zellkonzentration am Casy 1 (Fa. Schärfe). Hierzu wurden die Zellen in jedem Loch durch 10 -maliges Ansaugen und Ausblasen mit 1000er Pipette gemischt und sofort 1:100 (bei stärkerem Zellwachstum 1:200) mit Casyton verdünnt. Es erfolgte eine Mittelwertbestimmung der Zelldichte aus jeweils 3 identisch angesetzten Proben eines Versuchsansatzes.

Das Oligonucleotid-FDA-Konjugat KO_1 aus Beispiel 4 wurde bei vier Konzentrationen auf die antiproliferative Wirkung von A549 Tumorzellen getestet. Es hemmte die Proliferation ohne Zugabe eines Penetrationsverstärkers. Das entsprechende Oligonucleotid ohne F3-Konjugat (ON1) hemmt die Proliferation nur nach Komplexbildung mit einem Penetrationsverstärker (CellFectin, Fa. Gibco-BRL). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Säugerzellen: Bezeichnung der Zelllinie	Fluoreszenz nach 5 min		Fluoreszenz nach 20 min		Fluoreszenz nach 60 min		Fluoreszenz nach 120 min	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Reh	+	-	+	-	++	-	++	*
K562			(+)		+		+	
Lu 18					(+)		+	
KB3-1					+		+	
Ptk 2					(+)		+	

Tabelle 1: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Aufnahme von FDA-markierten Oligonukleotiden (Konjugat Oligonukleotid-FDA) in Säugerzellen.

- 5 A: Inkubation mit FDA-markierten Oligonukleotiden KO_1 und KO_3
B: Inkubation mit Fluorescein-markierten Oligonukleotiden KO_2 und KO_4



(+) schwache Aufnahme

+ mittelstarke Aufnahme

10 ++ sehr starke Aufnahme

- keine Aufnahme

* Aufnahme nur in geschädigte Zellen

Insektenzellen	Fluoreszenz nach 20 min		nach 60 min		nach 120 min	
	A	B	A	B	A	B
SF9 Zellen	+	-	++	-	++	-

- 15 Tabelle 2: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Aufnahme von FDA-markierten Oligonukleotiden in Insektenzellen (Legende s. Tabelle 1).



Organismus	Fluoreszenz nach 20 min		Fluoreszenz nach 60 min		Fluoreszenz nach 120 min	
	A	B	A	B	A	B
Bac. subtilis (6633) #	-	-	-	-	+	-
L. bulgaricus #	-	-	+	-	+	-
E. coli (K12) #	-	-	+	-	+	-
Yarrowia lipolytica # (Wildform H 222)	-	-	-	-	+	-
Saccaromyces cerevisiae #	-	-	-	-	+	-

Fusarium culmorum -Sporen (JP15, Pilz)	(+)	-	+	-	+	-
Reticulomyxa filosa- Cysten (Süßwasserramoebe)	-	-	++ besond. Nuklei	-	++	-
Haematococcus pluvialis (Schneealge, Flagellat)	-	-	+	-	+	-
Chlorogonium sp. (Grünalge, Flagellat)	-	-	+	-	+	-
Dunaliella salina (Meeres-Diatomee)	-	-	+	-	+	-

Tabelle 3: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Aufnahme von FDA-markierten Oligonukleotiden in verschiedene Organismen.

A: Inkubation mit FDA-markierten Oligonukleotiden KO_1 und KO_3

5 B: Inkubation mit Fluorescein-markierten Oligonukleotiden KO_2 und KO_4
(legende zur bewertung s. Tabelle 1)

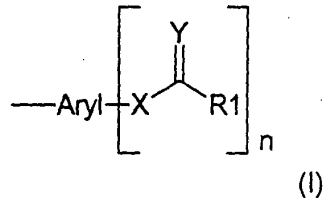
Aufnahme erfolgt nur in Teil der Zellen dieser schnellteilenden Organismen

Substanz	Zelldichte	% Inhibition
ohne	5.96	-
FDA	6.05	- 1.5
100 nM KO_1	5.65	5.2
200 nM KO_1	5.3	11.1
500 nM KO_1	5.03	15.6
1000 nM KO_1	4.16	30.2

10 Tabelle 4: Ergebnisse aus Beispiel 8.

Patentansprüche:

1. Konjugat bestehend aus einem zu transportierenden Molekül und mindestens einem Aryl-Rest der Formel I,



wobei

Aryl eine Gruppe ist, die mindestens einen Ring enthält, der aromatischen Charakter besitzt;

X O oder N ist;

Y O, S oder NH-R² ist;

R¹ ein substituierter oder unsubstituierter C₁-C₂₃ Alkylrest, der gerade oder verzweigt sein und Doppel- und/oder Dreifachbindungen enthalten kann, ist;

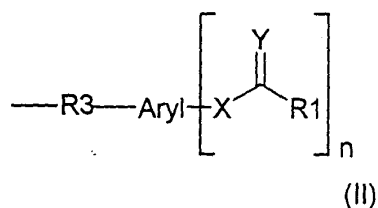
R² ein substituierter oder unsubstituierter C₁-C₁₈ Alkylrest, der gerade oder verzweigt sein und Doppel- und/oder Dreifachbindungen enthalten kann, ist; und

n eine ganze Zahl größer oder gleich 1 ist.

wobei der Aryl-Rest entweder direkt über eine chemische Bindung oder indirekt über eine chemische Gruppe an das zu transportierende Molekül gebunden ist, wobei die chemische Gruppe keine CH₂-S-Gruppe ist, wenn die Bindung über eine Internukleotid Phosphodiester-Bindung des zu transportierenden Moleküls erfolgt.

2. Konjugat nach 1, wobei das zu transportierende Molekül ein Makromolekül mit einem Molekulargewicht > 500 Dalton ist.

3. Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 und 2, wobei das zu transportierende Molekül ein Polynukleotid, ein Polypeptid oder ein Polysaccharid ist.
- 5 4. Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, wobei das zu transportierende Molekül ein Oligonukleotid ist.
5. Konjugat nach Anspruch 4, wobei das Oligonukleotid modifiziert ist.
- 10 6. Konjugat nach Anspruch 1, wobei das zu transportierende Molekül eine niedermolekulare Verbindung mit einem Molekulargewicht < 500 Dalton ist.
7. Konjugat nach Anspruch 6, wobei die niedermolekulare Verbindung ein Mononukleotid ist.
- 15 8. Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, wobei die chemische Gruppe zusammen mit dem Aryl-Rest die Formel II hat,

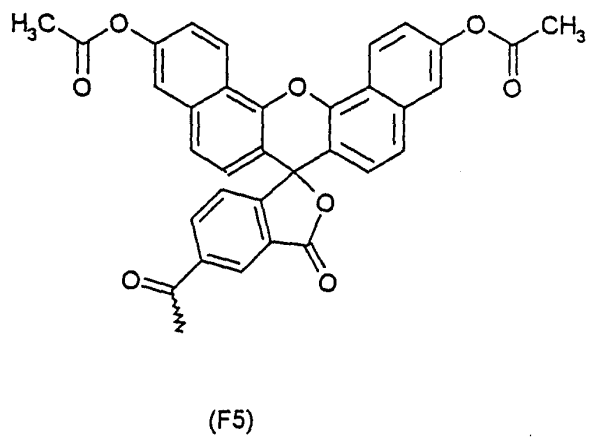
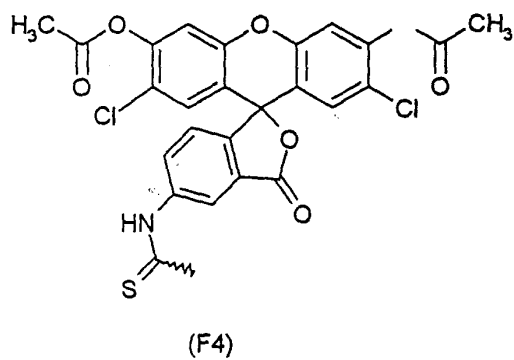
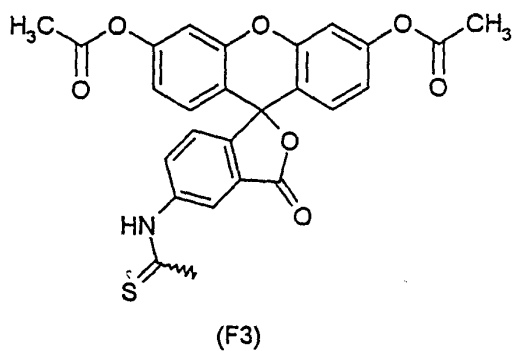
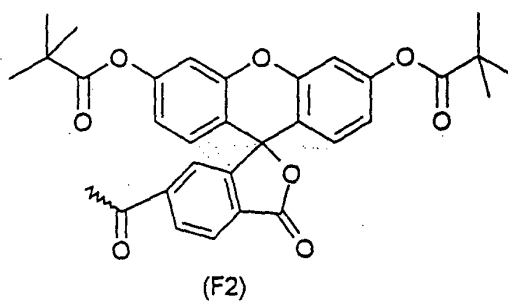
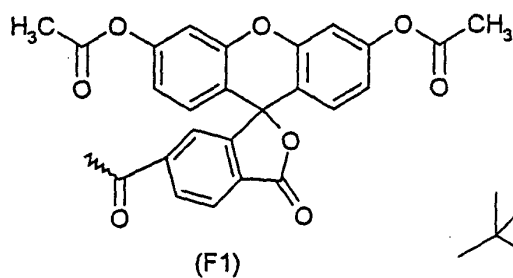


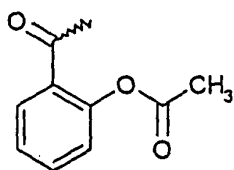
wobei Aryl, X, Y und R¹ wie oben definiert sind und

R³ die chemische Gruppe bedeutet, wobei R³ vorzugsweise eine ---C(=O)--- Gruppe oder eine ---NH-C(=S)--- Gruppe ist.

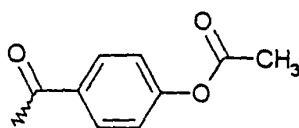
9. Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, wobei die chemische Gruppe und der Aryl-Rest zusammen eine der Formeln F1 bis F11 haben, mit

5

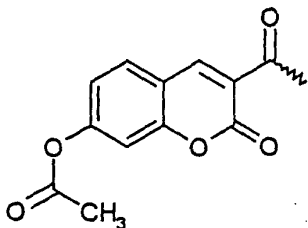




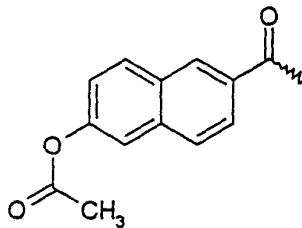
(F6)



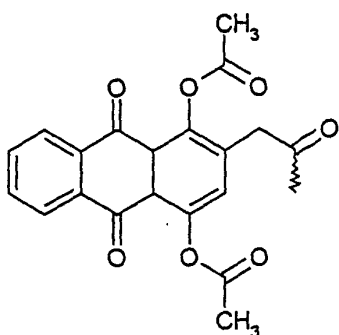
(F7)



(F8)



(F9)



(F11)

10. Konjugat bestehend aus

a) einem Polynukleotid, Oligonukleotid oder Mononukleotid und

5 b) ein oder mehreren Aryl-Resten der Formel I,

wobei der/die Aryl-Rest(e) entweder direkt über eine chemische Bindung oder indirekt über eine chemische Gruppe an das

5'-Ende und/oder

3'-Ende und/oder

10 ein oder mehrere Nukleobasen und/oder

ein oder mehrere Zuckerreste und/oder

ein oder mehrere Internukleosidbindungen gebunden ist/sind,

wobei die chemische Gruppe keine $\text{CH}_2\text{-S}$ -Gruppe ist, wenn die Bindung über eine Internukleotid Phosphodiester-Bindung erfolgt.

11. Verfahren zur Herstellung eines Konjugats enthaltend ein zu
 5 transportierendes Molekül und mindestens einen Aryl-Rest, wobei
 - a) ein zu transportierendes Molekül, das eine reaktive Funktion an der Position enthält, an die der Aryl-Rest gebunden werden soll, hergestellt wird; und
 - b) ein Arylrest hergestellt wird und
 - c) das zu transportierende Molekül mit dem Aryl-Rest zum Konjugat umgesetzt wird.
- 10 12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die reaktive Funktion eine Aminogruppe, Mercaptogruppe, Chloracetylgruppe, Isocyanatgruppe, Isothiocyanatgruppe, Carbonsäuregruppe, N-Hydroxysuccinimidgruppe oder eine Carbonsäurechloridgruppe ist.
- 15 13. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11 und 12, wobei die Umsetzung des zu transportierenden Moleküls mit dem Aryl-Rest bei einem pH-Wert $\leq 7,5$ durchgeführt wird.
- 20 14. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11 bis 13, wobei die Umsetzung des zu transportierenden Moleküls mit dem Aryl-Rest bei einem pH-Wert von 7,0 durchgeführt wird.
- 15 23 15. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 11 bis 14, wobei das zu transportierende Molekül ein Polynukleotid, Oligonukleotid oder Mononukleotid ist.
16. Verwendung eines Aryl-Restes der Formel I oder II, der an ein zu transportierendes Molekül gebunden ist, zum Transport dieses Moleküls über eine biologische Membran.
- 30 17. Verfahren zum Transport eines Moleküls über eine Membran, wobei
 - a) ein Konjugat hergestellt wird, bei dem das zu transportierende Molekül an mindestens einen Aryl-Rest der Formel I oder II gebunden ist, und
 - b) das Konjugat mit der Membran inkubiert wird.

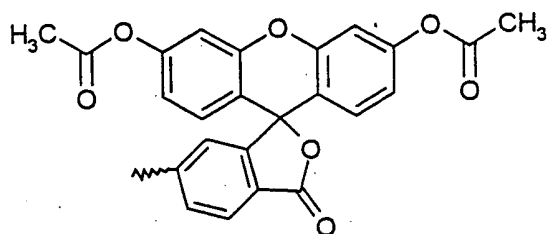
18. Verfahren zum Transport eines Moleküls in eine Zelle, wobei
- a) ein Konjugat hergestellt wird, bei dem das zu transportierende Molekül an mindestens einen Aryl-Rest der Formeln I oder II gebunden ist, und
 - 5 b) das Konjugat mit der Zelle inkubiert wird, woraufhin
 - c) das Konjugat in die Zelle transportiert wird, ohne daß der Aryl-Rest abgespalten wird.
19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die Zelle eine eukaryotische oder eine
- 10 prokaryotische Zelle ist.
20. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 und 19, wobei die
- () Zelle eine Bakterienzelle, Hefezelle oder eine Säugetierzelle ist.
- 15 21. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 20, wobei die Zelle eine humane Zelle ist.
22. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 21, wobei die Zelle eine Tumorzelle ist.
- 20 23. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, wobei
- a) ein pharmazeutischer Wirkstoff oder ein Derivat desselben hergestellt wird, der/das mindestens eine reaktive Funktion an einer Position enthält, an die ein Aryl-Rest gebunden werden soll,
 - 25 b) ein Aryl-Rest der Formel I oder II hergestellt wird
 - c) der pharmazeutische Wirkstoff oder dessen Derivat mit diesem Aryl-Rest zum Konjugat umgesetzt wird und das Konjugat
 - d) gegebenenfalls mit weiteren Zusatz- und/oder Trägerstoffen versetzt wird.
- 30 24. Arzneimittel enthaltend ein Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10.
25. Diagnostikum enthaltend ein Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10.

26. Test-Kit enthaltend ein Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10.

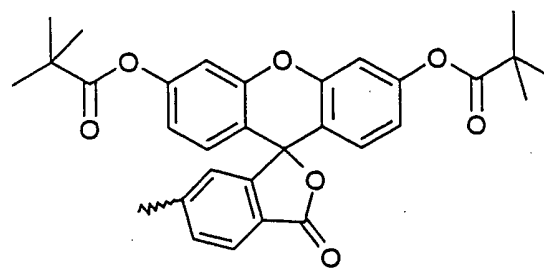
Zusammenfassung:

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Konjugate, Verfahren zu deren Herstellung und die Verwendung dieser Konjugate zum Transport von
- 5 niedermolekularen Verbindungen und Makromolekülen über biologische Membranen, insbesondere zum Transport von Molekülen in Zellen. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Arzneimittel und Diagnostika sowie Test-Kits in denen diese Konjugate vorliegen bzw. eingesetzt werden.

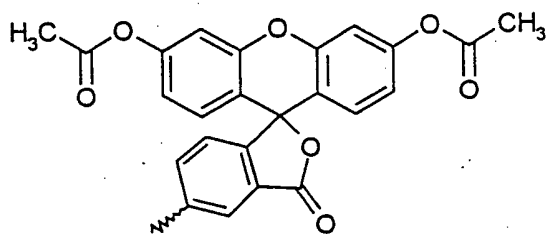
Abbildung 1



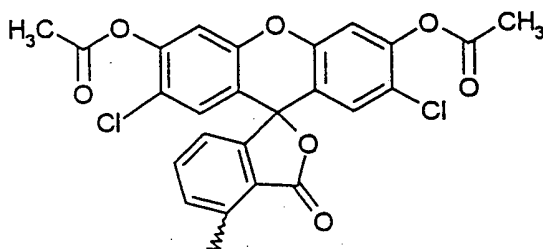
(F1')



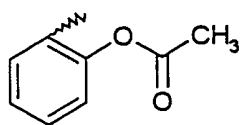
(F2')



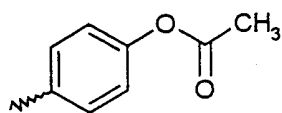
(F3')



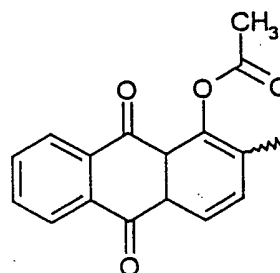
(F4')



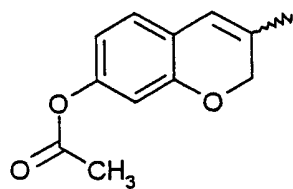
(F6')



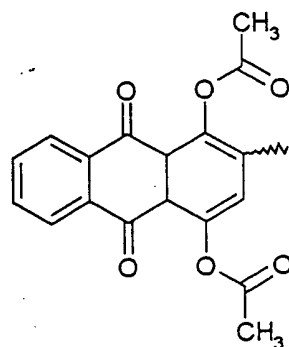
(F7')



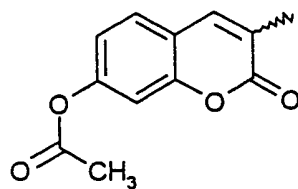
(F10')



(F9')



(F11')



(F8')

Abbildung 2a:

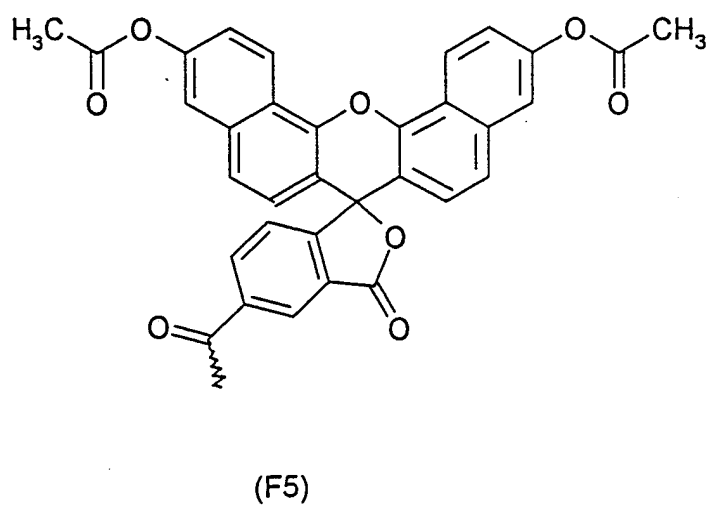
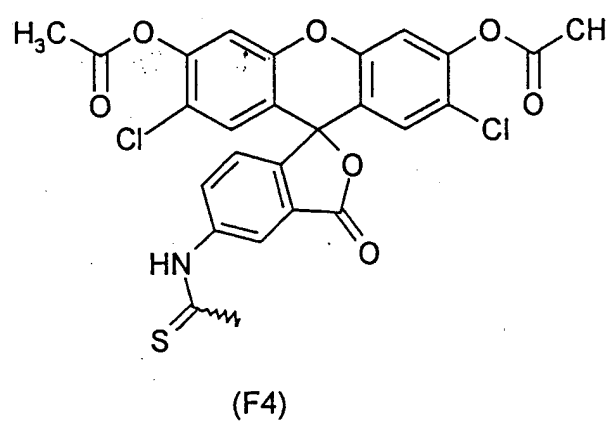
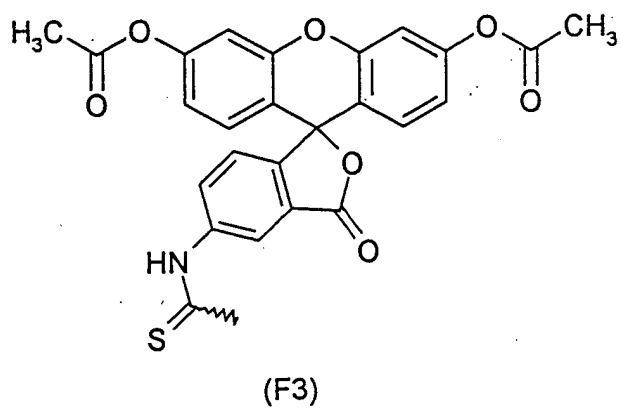
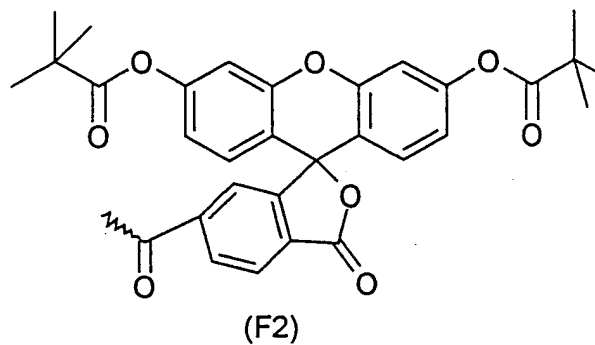
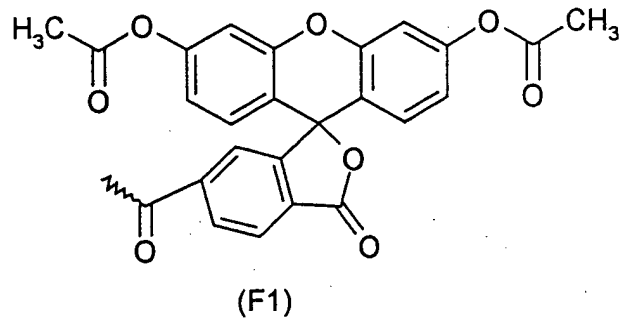
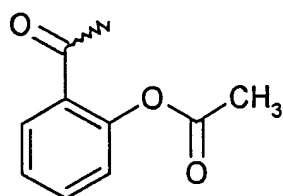
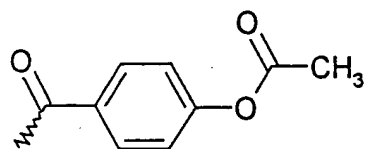


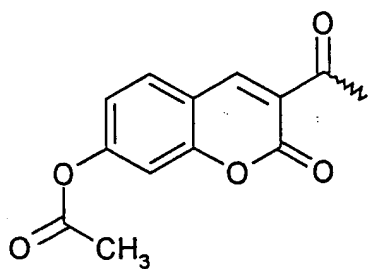
Abbildung 2b:



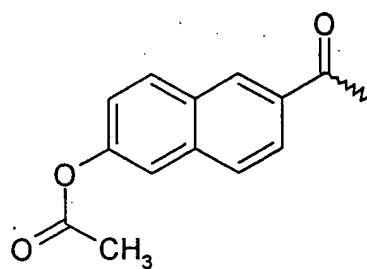
(F6)



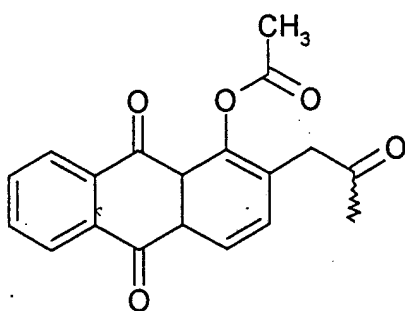
(F7)



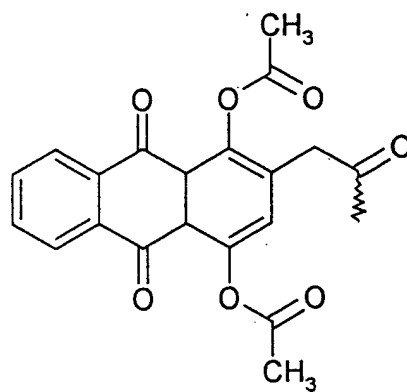
"F8"



"F9"



(F10)



(F11)

Abbildung 3:

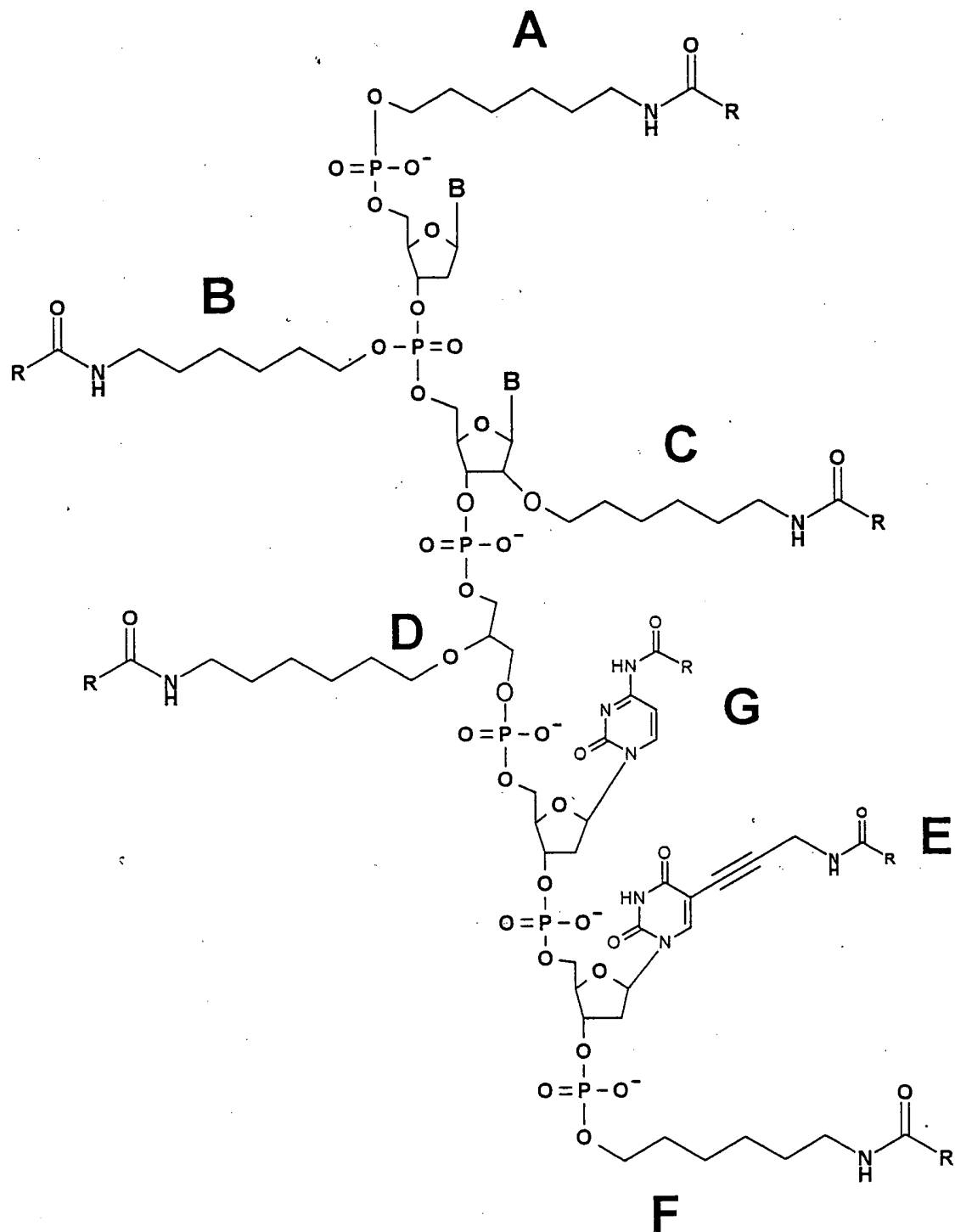


Abbildung 4:

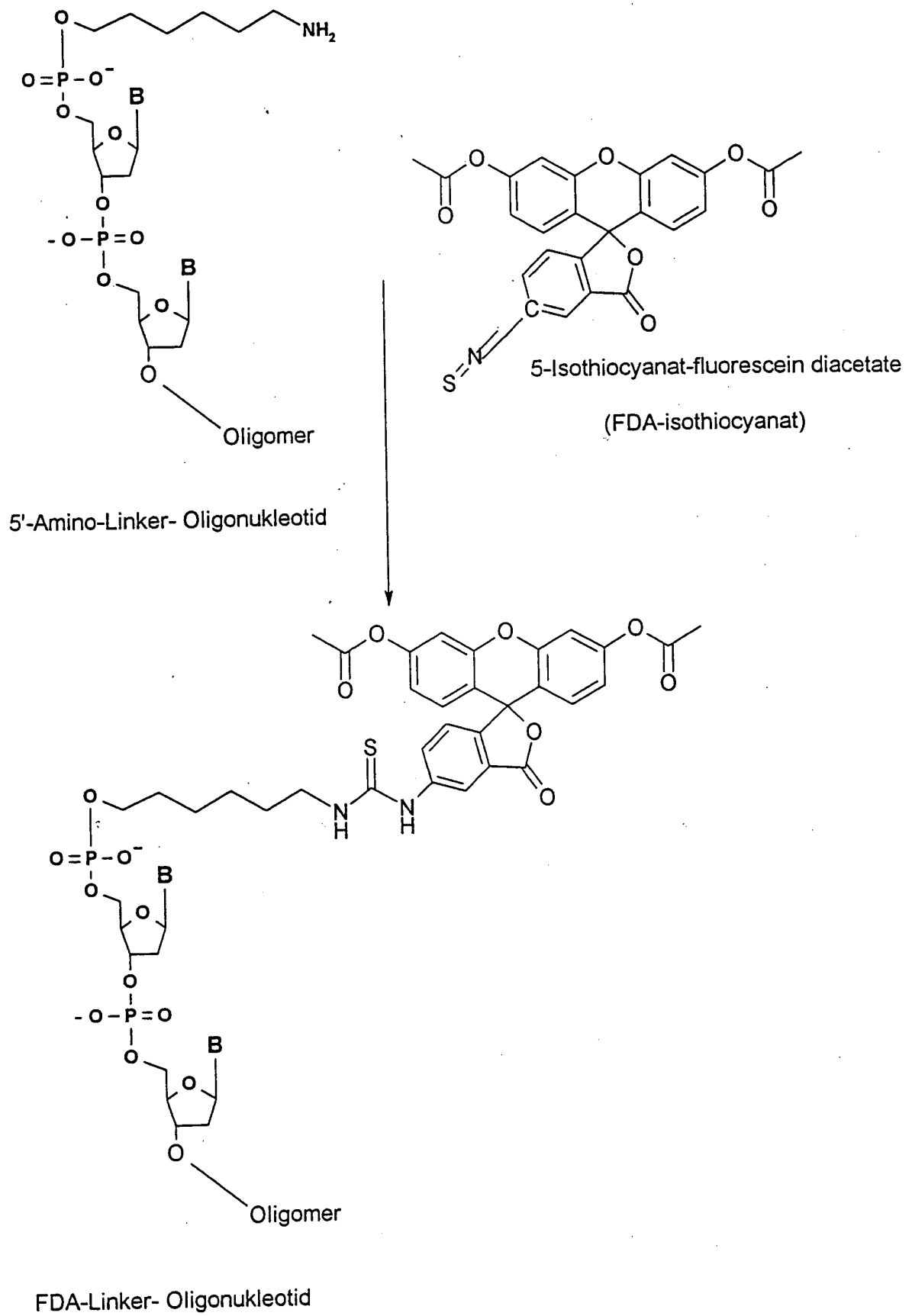


Abbildung 5

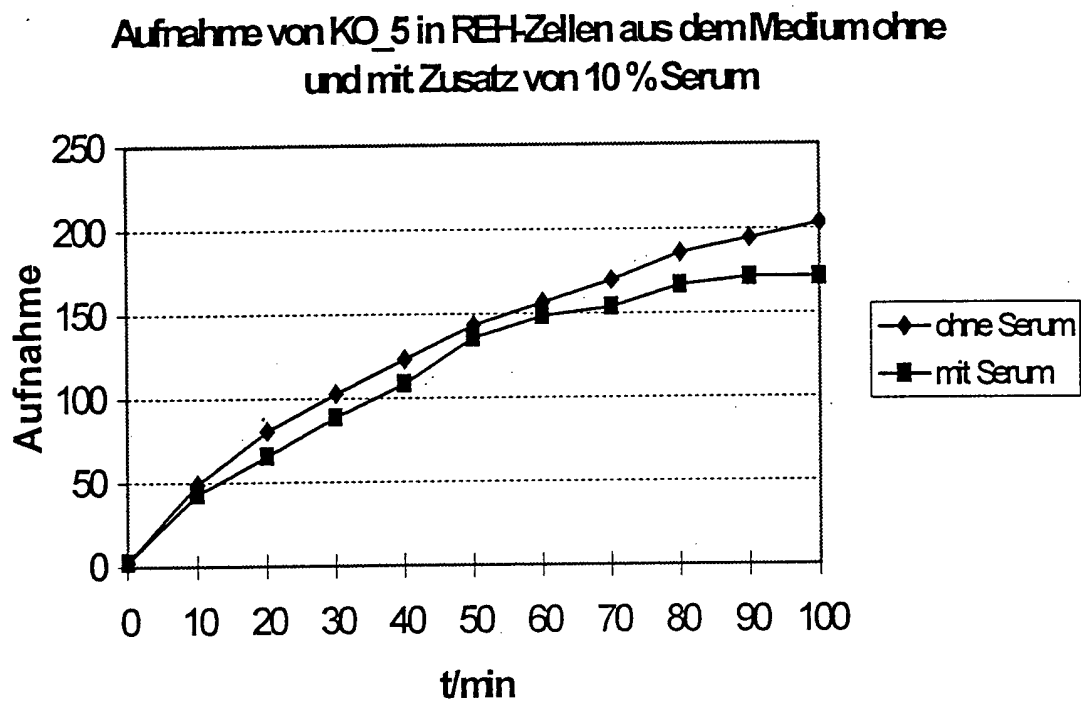


Abbildung 6

Aufnahme von KO_1 und KO_2 in REH-Zellen

